

Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Nicole Bruns

geboren am 06.09.1986 in Minden

2015

Referent:	Prof. Dr. Markus Kalesse
Korreferent:	Prof. Dr. Marc Stadler
Tag der Promotion:	20. Februar 2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2011 bis November 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Kalesse in der Abteilung Medizinische Chemie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig angefertigt.

Kurzfassung

Nicole Bruns

Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen

Schlagworte: Naturstoffe, Isolierung, Strukturaufklärung, Epiphyten, Baceridin, Myxobakterien, Spirangien, Targetsuche, Dereplikation

Die vorliegende Dissertation ist in zwei Teile unterteilt. Im ersten Teil wurden zwei pflanzen-assoziierte epiphytische Mikroorganismen, die eine antagonistische Wirkung gegen den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* zeigten, auf ihre Sekundärmetabolitenproduktion hin untersucht. Neben dem literaturbekannten Baceridin und seiner azyklischen Form, wurden ein Tetrapeptid und ein zyklisches Hexapeptid aus dem Stamm *Bacillus cereus* isoliert. Aus dem Hefeisolat *Metschnikowia pulcherrima* wurden zwei Indolderivate identifiziert. 2,5-Diketopiperazine wurden in beiden Stämmen gefunden. Auf Grund der bemerkenswerten Proteasomaktivität des Baceridins wurden sechs verschiedene zyklische Hexapeptide unter Anwendung des Alaninscan-Verfahrens synthetisiert, um die essentiellen molekularen Bestandteile, die für die biologische Aktivität verantwortlich sind, zu identifizieren.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurde der Myxobakterienstamm *Sorangium cellulosum* So ce90 untersucht, aus dem die Spirangiene A und B im Jahr 2005 entdeckt werden konnten. Strukturell besitzen die Spirangiene ein 6,6-Spiroketalgrundgerüst und eine Pentaen-Seitenkette. In dieser Arbeit wurden neben den Spirangien A und B weitere elf Spirangienderivate isoliert. Die Strukturaufklärung wurde unter Zuhilfenahme von NMR-spektroskopischen Methoden, Massenspektrometrie, biosynthetischen Analysen und statistischen Analysen des PKS-Genclusters durchgeführt. In Zytotoxizitätstests gegen L-929- und KB-3-1-Zelllinien zeigten die Spirangienderivate sehr hohe Bioaktivitäten im nanomolaren Bereich. In biochemischen Untersuchungen wurde ein mögliches Target von Spirangien A, das Ras-GTPase aktivierende Protein IQGAP1, identifiziert.

Des Weiteren wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gerwick vom Scripps Institut für Ozeanographie (SIO, La Jolla, San Diego) ein Verfahren zur Dereplikation von Naturstoffen, basierend auf dem Vergleich von MS/MS-Daten einer LC-MS-Anlage entwickelt und angewendet.

Abstract

Nicole Bruns

Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Microorganisms

Keywords: Natural products, isolation, structure elucidation, epiphytes, baceridin, myxobacteria, spirangien, target search, dereplication

This thesis is divided into two different parts. In the first, part two plant-associated epiphytic microorganisms with an antagonistic effect against the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* were analyzed for their production of secondary metabolites. In addition to known baceridin and its open-chain structure a tetrapeptide and a new cyclic hexapeptide were isolated from the strain of *Bacillus cereus*. The analysis of a yeast strain of *Metschnikowia pulcherrima* lead to the identification of two indole derivatives. 2,5-Diketopiperazines were found in both strains. Because of the remarkable proteasome-inhibiting activity of baceridin, six different hexapeptides were synthesized to identify the essential molecular elements responsible for the high biological activity by using the alanine scan method.

In the second part of this thesis, the analysis of the myxobacterium strain *Sorangium cellulosum* So ce90 from which the spirangiens A and B were isolated in 2005 is described. The structural characteristics of spirangiens are a 6,6-spiroketal core structure and a pentaene side chain. In this work, spirangien A and B and eleven spirangien derivatives were identified. The structure elucidation was performed by NMR spectroscopy, mass spectrometry, biosynthetic studies and statistical analysis of the PKS gene cluster. In cytotoxicity assays, the spirangiens showed high bioactivities against L-929 mouse fibroblasts and KB-3-1 cell lines in the nanomolar range. In further biochemical studies, the Ras-GTPase activating protein IQGAP1 was identified to be a possible target of spirangien A.

In addition, a new computational method for the dereplication of natural products was developed in cooperation with the group of W. H. Gerwick at the Scripps Institution of Oceanography (SIO, La Jolla, San Diego) and applied to some examples. This method is based on the comparison of MS/MS data from an LC-MS system.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Sekundärstoffe aus Mikroorganismen	3
1.1.1	Epiphyten und daraus isolierte Metaboliten	3
1.1.2	Antagonistische Mikroorganismen gegen <i>Venturia inaequalis</i>	4
1.1.3	Zyklische Peptide.....	6
1.2	Myxobakterien und daraus isolierte Metaboliten	8
1.2.1	<i>Sorangium cellulosum</i> und daraus isolierte Metaboliten	9
1.3	Die Murata Methode zur Aufklärung der relativen Stereochemie.....	13
1.4	Dereplikation bekannter Naturstoffe.....	14
1.5	Targetsuche von Wirkstoffen.....	16
2	Aufgabenstellung	20
3	Sekundärmetaboliten aus <i>B. cereus</i> und <i>M. pulcherrima</i>	21
3.1	Isolierung der Reinsubstanzen	21
3.1.1	Isolierung aus <i>B. cereus</i> (IBlü-4, 4 L-Kultur).....	22
3.1.2	Isolierung aus <i>M. pulcherrima</i> (H24, 1 L-Kultur)	26
3.1.3	Isolierung aus einer Kokultur von <i>B. cereus</i> und <i>M. pulcherrima</i> (IBlü-4/ H24, 1 L-Kultur)	27
3.1.4	Isolierung aus <i>B. cereus</i> (1 L-Kultur)	28
3.1.5	Vergleich Metabolitenproduktion zwischen IBlü-4, H24 und Kokultur	29
3.2	Diketopiperazine	31
3.2.1	Strukturaufklärung	31
3.2.2	Biosynthese	37
3.3	Oligopeptide.....	38
3.3.1	Strukturaufklärung von Baceridin (D8)	38

3.3.2	Strukturaufklärung des azyklischen Baceridins (D9)	40
3.3.3	Strukturaufklärung des Tetrapeptids D10	41
3.3.4	Strukturaufklärung des Hexapeptids D11	43
3.3.5	Bioaktivität von Baceridin (D8).....	45
3.3.6	Alanintest von Baceridin (D8)	48
3.3.7	Biosynthese von Baceridin	49
3.4	Weitere Sekundärmetaboliten aus <i>B. cereus</i> und <i>M. pulcherrima</i>	50
3.4.1	2-Phenylacetamid (D12)	50
3.4.2	Tryptophol (D13)	51
3.4.3	1 <i>H</i> -Indol-3-carbaldehyd (D14)	53
3.5	Zusammenfassung und Diskussion.....	54
4	Spirangiene aus So ce90	56
4.1	Isolierung der Reinsubstanzen	56
4.1.1	Aufreinigung einer 12 L-Fermentation	57
4.1.2	Aufreinigung einer 70 L-Fermentation	58
4.2	Strukturaufklärung der Spirangiene A (S1) und B (S2).....	60
4.3	Strukturaufklärung der Spirangienderivate.....	62
4.3.1	Spirangien G (S3)	62
4.3.2	Spirangiene H (S4) und I (S5)	63
4.3.3	Spirangien J (S6) und K (S7).....	64
4.3.4	Spirangien L (S8) und M (S9)	67
4.3.5	Spirangien N (S10)	68
4.3.6	Spirangien O (S11) und P (S12)	69
4.3.7	Spirangien Q (S13)	72
4.4	Biologische Aktivität	75
4.5	Biosynthese der Spirangiene.....	77
4.6	Untersuchungen zum Target von Spirangien A.....	81

4.6.1	Darstellung des biotinylierten Spirangien A (B-S1).....	81
4.6.2	Pulldown-Assay	84
4.6.3	Lokalisierungsstudien	87
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	91
5	Molekulares Network zur Dereplikation	96
5.1	Entwicklung des Molekularen Networks	96
5.1.1	Methodenbeschreibung	96
5.2	Molekulares Network aus Cyanobakterien	98
5.2.1	Aufarbeitung der Cyanobakterien	99
5.2.2	Networking	101
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	106
6	Experimenteller Teil	108
6.1	Allgemeines	108
6.1.1	Instrumentelle Analytik	108
6.1.2	Chromatographie.....	110
6.1.3	Festphasen-Peptidsynthese	111
6.1.4	Mikrobiologische Methoden	112
6.1.5	Molekulares Netzwerk	127
6.2	Charakterisierung der Verbindungen	128
6.2.1	2,5-Diketopiperazine.....	128
6.2.2	Weitere Oligopeptide	134
6.2.3	Synthese der Baceridinderivate.....	137
6.2.4	Weitere Sekundärmetabolite aus <i>B. cereus</i> und <i>M. pulcherrima</i>	147
6.2.5	Spirangienderivate	148
7	Literaturverzeichnis	163
8	Anhang.....	175

Abkürzungsverzeichnis		Et ₃ N	Triethylamin
1D	Eindimensional	<i>et al.</i>	und andere
2D	Zweidimensional	EtOAc	Ethylacetat
ACP	Acyl-Carrier-Protein	EtOH	Ethanol
AT	Acetyltransferase	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	g	Gramm
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	GB	Gaussian factor
BHT	Butylhydroxytoluol	GC	Gaschromatographie
CCMS	Capture Compound Mass	GTP	Guanosintriphosphat
	Spectrometry	h	Stunde
CD ₃ OD	deutერიertes Methanol	H ₂ O	Wasser
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan	HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)
COSY	Correlated Spectroscopy		1,3,3,3-tetramethyluronium
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol		Hexafluorphosphat
DH	Dehydratase	HECADE	Heteronuclear couplings from
DIPEA	Diisopropylethylamin		ASSCI-Domain Experiments with
DKP	2,5-Diketopiperazin		E.COSY-type cross peaks
DMF	Dimethylformamid	HMBC	Heteronuclear Multiple Bond
DMSO-d ₆	deutერიertes		Correlation
	Dimethylsulfoxid	HMM	Hidden Markov Model
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	HPLC	High Performance Liquid
ER	Enoylreduktase		Chromatography
ESI	Elektrospray-Ionisation		(Hochleistungschromatographie)

HRMS	High Resolution Mass	mg	Milligramm
	Spectrometry	µg	Mikrogramm
HSQC	Heteronuclear Single	MHz	Mega-Hertz
	Quantum Coherence	min	Minute
HTS	High Throuput Screening	mL	Milliliter
Hz	Hertz	MRSA	Methicillin-resistenter
HZI	Helmholtz Zentrum für		<i>Staphylococcus aureus</i>
	Infektionsforschung	MS	Massenspektrometrie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische	MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
	Konzentration	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-
IL	Interleukin		2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>J</i>	Kopplungskonstante	<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
K	Kelvin	NF/κB	Nuclear Factor ‘kappa-light-
K _a	Bindungskonstante		chain-enhancer’ of activated
Kb	Kilo-Basenpaare		B-cells
kDa	Kilo-Dalton	ng	Nanogramm
KR	Ketoreduktase	nm	Nanometer
KS	Ketosynthase	nM	Nanomolar
LB	Line broadening	NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
LC	Flüssigchromatographie	NOE	Kern-Overhauser-Effekt
<i>M. pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthase
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-	PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
	Desorption/ Ionisation	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
MeOH	Methanol	PKS	Polyketidsynthase

ppm	Parts per Million	UPLC	Ultra Performance Liquid
Q-Tof	Quadrupol-Time-of-Flight		Chromatography
RNA	Ribonukleinsäure	UV	Ultraviolett
ROESY	Rotating-frame Overhauser	VLC	Vakuumflüssigkeits-
	Spectroscopy		Chromatographie
RP	Reversed Phase		
<i>S. cellulorum</i>	<i>Sorangium cellulorum</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-		
	Polyacrylamidgelelektro-		
	phorese		
SILAC	Stable Isotope Labeling by		
	Amino Acids in Cell Culture		
sp.	Spezies		
SPE	Festphasenextraktion		
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-		
	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-		
	uronium Tetrafluorborat		
TE	Thioesterase		
THF	Tetrahydrofuran		
TOCSY	Total Correlated		
	Spectroscopy		
t_R	Retentionszeit		
TRITC	Tetramethylrhodamin		

1 Einleitung

Naturstoffe zeichnen sich durch eine große strukturelle Vielfalt und eine breitgefächerte biologische Wirkung aus. Schon in alten Überlieferungen wurden tausend Jahre vor Christi Extrakte aus Pflanzen und Tieren zu Heilungszwecken eingesetzt.^[1] Ein Meilenstein der modernen Naturstoffforschung war die Entdeckung des antibiotisch wirksamen Penicillins aus *Penicillium rubens* durch Alexander Fleming im Jahre 1928.^[2] Seitdem machen Naturstoffe und aus ihnen abgeleitete Strukturen den Großteil der Therapeutika aus: Von 20 zugelassenen Arzneimitteln im Jahr 2010 – Peptide und Vakzine ausgenommen – lag der Anteil der Naturstoffe oder aus Naturstoffen abgeleiteten semisynthetischen Strukturen bei 50%.^[3] Dabei handelte es sich auch gleichzeitig um die zweitniedrigste Zahl der im Zeitraum von 1981–2010 zugelassenen Medikamente. Beispiele von Naturstoffen, die in der Medizin eingesetzt werden, sind das Malariamittel Artemisinin,^[4] das bei Pilzinfektionen eingesetzte Amphotericin B^[5] und das Zytostatikum Paclitaxel^[6] (Abbildung 1).

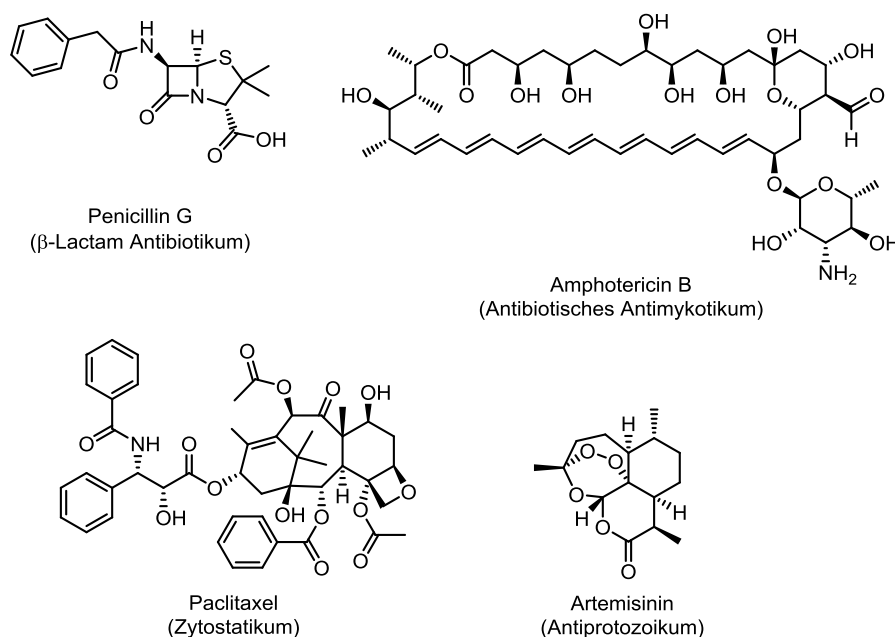


Abbildung 1: In der Medizin eingesetzte Naturstoffe.

Das Sesquiterpen Artemisinin wurde von Abdin *et al.* und Klayman *et al.* aus *Artemisia annua* isoliert.^[4,7] Anfangs konnte der medizinische Bedarf nicht gedeckt werden, da es nur in sehr geringen Mengen in *A. annua* enthalten ist und die Synthese ökonomisch nicht realisierbar war.^[8] Der Einsatz der synthetischen Biologie, in der gentechnisch veränderte

Hefezellen eine Vorstufe synthetisieren und anschließend Artemisinin photochemisch gebildet wird, verhalf zu der Produktion des Malariamittels im großen Maßstab.^[9] Das Polyen-Makrolakton Amphotericin B konnte 1955 aus *Streptomyces nodosum* isoliert werden^[10] und ist seit 1960 als Amphotericin-B-Desoxycholat-Antimykotikum erhältlich.^[5] Die Nebenwirkungen von Amphotericin B, die sich als nephrotoxische Effekte äußerten, konnten 1990 durch die Entwicklung von speziellen Lipid-Formulierungen verringert werden.^[11] Paclitaxel konnte erstmals 1971 von Wani *et al.* durch Extraktion der Rinde der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert werden.^[12] Der klinische Einsatz wurde durch die nur geringen Mengen an enthaltenem Paclitaxel und der nur sehr langsam nachwachsenden Pazifischen Eibe erschwert. Durch Semisynthese aus Baccatin III, das in den Nadeln der weit verbreiteten Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) vorkommt, und durch biotechnologische Gewinnung von Paclitaxel aus Eibenzellkulturen, konnte ein Zugang zur Herstellung von Paclitaxel in großem Maßstab gefunden werden.^[13]

Durch zunehmende Resistenzen, besonders vom Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), ist die Entwicklung neuer Antiinfektiva von großer Bedeutung.^[14] Die Zahl der Medikamente, die auf Naturstoffen basieren, ist in den letzten Jahren jedoch zurückgegangen. Besonders in der Antibiotika-Forschung wird die Ungleichmäßigkeit zwischen Resistenzentwicklung und Forschungserfolg immer größer.^[15] Meist sind die komplexen Strukturen von bioaktiven Naturstoffen synthetisch nur unter großem Aufwand herzustellen, und die Ausbeuten durch Isolierung aus natürlichen Quellen begrenzt. Da die Entwicklung eines neuen Medikaments etwa 10–15 Jahre dauert und mindestens 800 Millionen US-Dollar kostet,^[16] ist das Entwickeln neuer Antiinfektiva trotz vorhandener Behandlungskosten bereits heute von großer Bedeutung. Auch die Entwicklung eines Hochdurchsatz-Screenings (HTS), einer automatisierten Methode zur Durchführung von biochemischen, genetischen oder pharmakologischen Tests an Zehntausenden von Molekülen, bringt nicht immer eine geeignete Leitstruktur hervor.^[17] In der Zukunft werden die Anforderungen an HTS steigen, und es werden neue Strategien nötig sein, um Kosten zu senken und die Effizienz zu steigern.^[18]

1.1 Sekundärstoffe aus Mikroorganismen

Allgemein wird im Stoffwechsel von Organismen zwischen Sekundär- und Primärmetaboliten unterschieden. Primärmetaboliten kommen ubiquitär vor. Zu ihnen gehören Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate.^[19] Die durch Mikroorganismen produzierten Sekundärmetabolite sind für das Wachstum und das Überleben des jeweiligen Organismus nicht essentiell. Zu den Vertretern der Sekundärmetaboliten gehören meist Terpene, Alkaloide, Phenolderivate und Polyketide.^[20] Terpene werden über den Acetat/ Mevalonat- oder den Glycerinaldehyd-3-phosphat/ Pyruvat-Weg gebildet. Sie werden als Toxine oder als Lockstoffe eingesetzt.^[20] Alkaloide, die aus Aminosäuren synthetisiert werden und zu denen auch das Opiat Morphin gehört, dienen als Pflanzenschutzmittel und einige besitzen auch pharmakologische Aktivitäten.^[20] Phenolderivate werden hauptsächlich über den Shikimisäure-Weg gebildet und kommen im Pflanzenschutz zum Einsatz.^[21] Polyketide, die durch Polyketid-Synthese aus Acetat-Malonat-Einheiten und Polyketidsynthasen-(PKS)-katalysiert biosynthetisch hergestellt werden, finden zum Beispiel Anwendung als Antibiotikum oder als Krebsmedikament.^[22] Fünzigtausend von über hunderttausend Sekundärmetaboliten, die von Mikroben und Pflanzen produziert werden und ein Molekulargewicht von unter 2500 g mol^{-1} besitzen, werden von Mikroorganismen gebildet.^[23,24] Von zwölftausend im Jahre 1995 bekannten Antibiotika wurden dabei 55% aus filamentösen Bakterien (Aktinomyceten) des Genus *Streptomyces*, 11% aus anderen Aktinomyceten, 12% aus nicht-filamentösen Bakterien und 22% aus filamentösen Pilzen isoliert.^[23,25] Somit zählen bioaktive sekundäre Metaboliten aus Mikroorganismen und Pflanzen, wie auch deren Derivate, heutzutage zu den am häufigsten verwendeten Therapeutika in der Human- und Veterinärmedizin.^[20,26]

1.1.1 Epiphyten und daraus isolierte Metaboliten

Eine für die Naturstoffchemie sehr interessante ökologische Gruppe von Mikroorganismen bilden die Epiphyten. Zu ihnen gehörten Viren, Bakterien, Pilze, Algen sowie Protozoen, die auf nahezu allen pflanzlichen Oberflächen vorkommen können.^[27,28] Die Mikroorganismen, die auf den Wurzeln leben, bilden mit der Wurzeloberfläche die Rhizosphäre und diejenigen, die auf der Blattoberfläche leben, die Phyllosphäre.^[29] Der Einfluss auf die Pflanze reicht dabei vom Parasitismus^[30] über Neutralismus^[31] bis hin zum Mutualismus,^[32] wobei bei vielen epiphytischen Mikroorganismen bestimmte

Umweltfaktoren und Entwicklungszyklen die jeweilige Wirkung beeinflussen.^[28,33,34] Die Phyllosphäre beispielsweise bietet durch wechselnde physikalische Bedingungen sowie durch Konkurrenz um Nährstoffe und Raum unter den Mikroorganismen untereinander ein stark beeinflusstes Habitat und somit an den Lebensraum stark angepasste Bakterien, Hefen und filamentöse Pilze.^[35] Außerdem entwickeln die Mikroorganismen Resistenzmechanismen gegen pflanzliche Abwehrstoffe und konkurrierende Mikroorganismen, und lassen diese Organismengruppe somit zu einer interessanten Quelle von bioaktiven Naturstoffen werden.^[36] Im Pflanzenschutz spielen Pflanzen-assoziierte Mikroorganismen eine wichtige Rolle und können als Antagonisten zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten eingesetzt werden.^[37]

Ein Beispiel eines Pflanzenschutzmittels, welches die Sporen des Bodenpilzes *Coniothyrium minitans* enthält, stellt Contans[®]WG dar, das 1997 erstmals in Deutschland zugelassen wurde.^[38] Da nur sehr wenige mikrobiologische Präparate zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten zugelassen werden, ist die Identifizierung von in Kulturmedien antagonistischer Mikroorganismen enthaltenen Wirkstoffen und die Aufklärung ihrer Wirkmechanismen wichtig. Außerdem könnten neue Erkenntnisse für medizinische Anwendungen gewonnen werden.

1.1.2 Antagonistische Mikroorganismen gegen *Venturia inaequalis*

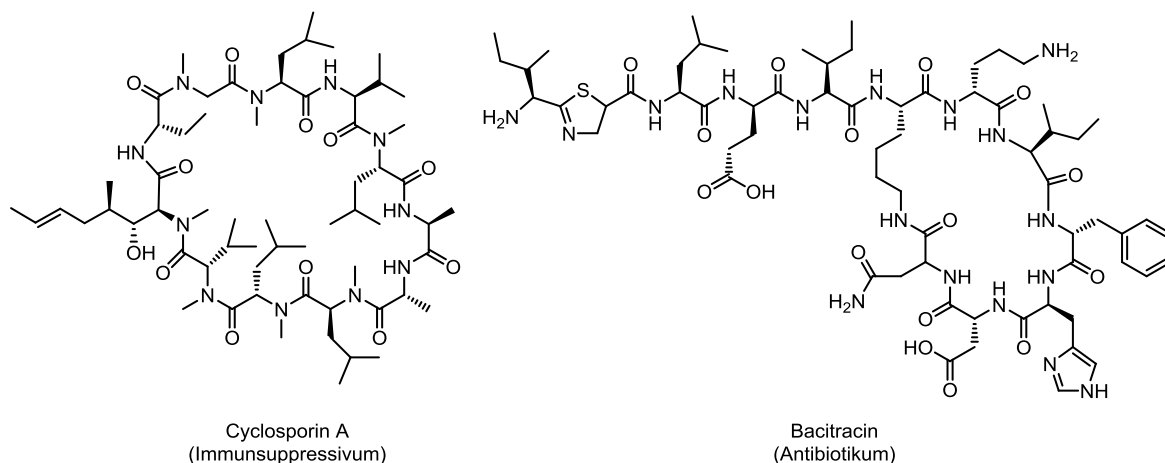
Dass Pflanzen-assoziierte Mikroorganismen eine wichtige Rolle im Pflanzenschutz und als Antagonisten zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten spielen,^[39,40] zeigt sich auch beim Befall der Nutzpflanze Apfel (*Malus domestica*) mit dem Pilz *Venturia inaequalis*, der als Apfelschorferreger einen weltweit verbreiteten Apfelschädling darstellt.^[41] Um hohe wirtschaftliche Einbußen durch den Apfelschorf zu vermeiden, wird nach effizienten Strategien zur Eindämmung der Krankheit gesucht. Da die bisherige Behandlung mit chemischen Fungiziden hohe Investitionen fordert,^[41] werden alternative Möglichkeiten, wie die Biokontrolle durch epiphytische Mikroorganismen der Phyllosphäre, erforscht.

1.1.2.1 Vorarbeiten zu Untersuchung von epiphytischen Mikroorganismen gegen *Venturia inaequalis*

In Untersuchungen zum Auffinden neuer und potenziell biologisch aktiver Naturstoffe aus epiphytischen Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Pilze) wurden verschiedene Stämme, die von der Oberfläche von Pflanzen isoliert wurden, am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Auling auf ihre Sekundärmetaboliten-Produktion hin analysiert. Es wurden gegen *Venturia inaequalis* antagonistische Mikroorganismen (26 Bakterien und 26 Hefen) und epiphytische Isolate von Blättern, Blüten und Schoten von *Arabidopsis thaliana* (12 Bakterien, 8 Pilze und 2 Hefen) gescreent. Die daraus isolierten Mikroorganismen zeigten eine Inhibierung des Myzelwachstums und der Sporenkeimung des Pilzes *Venturia inaequalis*.^[41–43] In Zusammenarbeit mit Dr. F. Sasse vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig und I. Reupke vom Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover wurden die Extrakte auf antimikrobielle Aktivität und auf Zytotoxizität untersucht. Der Extrakt der Hefe H24 (*Metschnikowia pulcherrima*) zeigte eine starke Wachstumshemmung auf *Bacillus subtilis* mit einem Hemmhofdurchmesser von 18 mm. Die Hefe wurde von Fiss *et al.* über morphologische, physiologische und chemotaxonomische Eigenschaften charakterisiert. In der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zeigte das epiphytische Isolat der Hefe H24 ein nahezu identisches Proteinmuster wie die Hefe *Metschnikowia pulcherrima* CBS 2244, die als Referenz diente.^[43] Im Screening der gegen *Venturia inaequalis* antagonistischen Mikroorganismen und epiphytische Isolate von Blättern, Blüten und Schoten von *Arabidopsis thaliana* wurden auch Zytotoxizitätstests mit L-929-Mausfibroblasten durchgeführt. Dabei fielen vor allem die Extrakte der bakteriellen Isolate der Blüten (IBlü-1, IBlü-2, IBlü-3 und IBlü-4) durch eine hohe Aktivität auf.

Bei dem zytotoxischen Isolat IBlü-4 handelte es sich um einen *Bacillus cereus*-Stamm. Allgemein lässt sich der Genus *Bacillus* in die Familie der *Bacillaceae* einordnen.^[44] Es handelt sich um ein stäbchenförmiges, gram-positives, bewegliches, endosporenbildendes Bakterium und vermehrt sich fakultativ anaerob, d.h. sie benötigen keinen Sauerstoff. Der Genus *Bacillus* lässt sich in viele Spezies unterteilen, darunter auch *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus thuringiensis*. Zusätzlich zu ihrer weiten Verbreitung in

Aus der Natur stammende zyklische Peptide mit verschiedenen biologischen Funktionen sind weit verbreitet. Sie besitzen eine höhere biologische Verfügbarkeit und eine größere Stabilität gegen enzymatischen Abbau im Vergleich zu linearen Peptiden, und sind damit wichtige Leitstrukturen für Pharmazeutika,^[46,47] wie auch das Immunsuppressivum Cyclosporin A^[48] zeigt (Abbildung 2). Es besteht aus elf Aminosäuren und unterdrückt die Immunabwehr, indem es indirekt das Enzym Calcineurin hemmt. Es wird vor allem in der Transplantationsmedizin verwendet, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. Es wurde aus *Trichoderma polysporum*,^[49] *Tolypocladium inflatum*^[50] und *Cylindrocarpum lucidum*^[51] isoliert. Ein weiteres Beispiel ist das im Jahr 1943 aus den Kulturen von *Bacillus subtilis*-Stämmen gewonnene Polypeptid Bacitracin.^[52] Es besteht aus elf Aminosäuren und hemmt die Zellwandbiosynthese einiger Bakterienarten. Außerdem ist es gegen gram-positive Bakterien und Neisserien wirksam.



Zyklische Hexapeptide wurden bisher seltener isoliert als zyklische Peptide mit größeren Ringgrößen.^[53] Einige isolierte Beispiele sind Mollamide,^[54] Comoramid A und B^[55] und Dolastatin I^[56] aus marinen Wirbellosen, Venturamide^[57] und Nostophycin^[58] aus Cyanobakterien sowie Glabrin A,^[59] Gypsin A-D^[60] und Dianthin C und E^[61] aus höheren Pflanzen. Die überwiegende Konfiguration der Aminosäuren der isolierten zyklischen

Hexapeptide ist die L-Konfiguration. Aus dem mit der Alge *Porphyra xyezoensis* assoziiert lebenden Fungus *Cladosporium* sp. konnte auch das Diketopiperazin Cyclo-(Pro-Val) isoliert werden (Abbildung 3).^[62] Es gehört zu einem der einfachsten zyklischen Peptide und besitzt durch seine inhibierende Wirkung auf phytopathogene Mikroorganismen großes Potential als biologisches Fungizid.

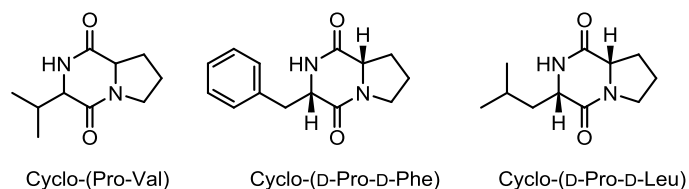


Abbildung 3: Beispiele von isolierten Diketopiperazinen.

Im Allgemeinen entstehen Diketopiperazine durch die Kondensation von zwei Aminosäuren und sind von der Isolierung aus Bakterien, wie zum Beispiel *Streptomyces* sp.,^[63] *Bacillus subtilis*^[64] und *Pseudomonas aeruginosa*,^[65] sowie aus Pilzen *Alternaria alternata*,^[66] *Penicillium* sp.^[67] und *Aspergillus*^[68] bekannt. Diketopiperazine werden von 90% der gram-negativen Bakterien produziert. Sie konnten aber auch schon aus gram-positiven Bakterien und aus Pilzen isoliert werden.^[69] Sie sind biosynthetisch ebenso wie synthetisch^[70] leicht zugänglich. Diketopiperazine besitzen einen einfachen Aufbau, auffällig ist dabei die Bevorzugung der Aminosäure Prolin als Baustein.^[71] Die biologische Aktivität dieser Substanzklasse geht von einer antibakteriellen^[72] und einer antifungalen^[73] über eine phytotoxische^[74] Wirkung bis hin zum Einsatz als Signalstoff in Quorum-Sensing Systemen.^[75] Cyclo-(D-Pro-D-Phe) und Cyclo-(D-Pro-D-Leu), die aus marinen Bakterien isoliert wurden, besitzen einen antibiotischen Effekt gegenüber dem Bakterium *Vibrio anguillarum*.^[72] Cyclo-(L-Pro-L-Phe), isoliert aus *Lactobacillus plantarum*, wirkt inhibierend auf das Wachstum der Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Penicillium roqueforti*.^[76] Das unter dem Namen Maculosin bekannte Cyclo-(L-Pro-L-Tyr) wurde aus dem Schimmelpilz *Alternaria alternata* isoliert und zeigt eine phytotoxische Wirkung gegen die Rispens-Flockenblume.^[74]

1.2 Myxobakterien und daraus isolierte Metaboliten

Eine weitere Gruppe der Mikroorganismen, die Myxobakterien, haben sich als eine reiche Quelle pharmazeutisch interessanter Verbindungen erwiesen.^[77] Myxobakterien produzieren durch ihren umfangreichen Sekundärmetabolismus eine Vielzahl unterschiedlicher Sekundärmetaboliten, und sind in den letzten drei Jahrzehnten verstärkt in den Blickpunkt der Naturstoffforschung geraten.^[78,79] Bisher wurden mehr als 100 individuelle Hauptstrukturen und ca. 600 Derivate identifiziert.^[78,80,81]

Myxobakterien sind gram-negative δ -Proteobakterien, die vor allem im Boden, aber auch in Baumrinden, faulenden Pflanzenmaterialien, Kot von Pflanzenfressern und in mariner Umgebung zu finden sind.^[80,82] Sie können sich durch Gleiten fortbewegen^[83] und zeichnen sich durch ihr Sozialleben und die Bildung von komplexen Fruchtkörpern bei Nahrungsmangel aus.^[84] Die Fruchtkörper können je nach Art verschiedene Formen und Farben annehmen. Sie bilden sich zu runden Myxosporen weiter, welche nur einen minimalen Stoffwechsel besitzen und vor Austrocknung geschützt sind.^[85] Dadurch sind sie fähig, die Nahrungsknappheit zu überdauern. Die Myxobakterien besitzen sehr große Genome von neun bis über zwölf Megabasenpaare.^[86]

Die Myxobakterien sind eine reiche Quelle für Polypeptide, nichtribosomale Polyketide oder eine Kombination daraus, während andere Strukturtypen aus Terpenoiden, Phenylpropanoiden und Alkaloiden bestehen.^[78] Seltener sind reine Polyketide wie die Aurafurone und die Spirangiene zu finden. Die meisten Strukturen werden von Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisiert.^[87]

Wegen der einheitlichen Strukturen und neuen Wirkmechanismen sind Naturstoffe aus Myxobakterien hervorragende Kandidaten in der Medikamentenentwicklung. So konnte zum Beispiel ein semisynthetisches Derivat von Epothilon B (Abbildung 4), ein am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung isolierter Naturstoff, erfolgreich durch das Pharmaunternehmen Bristol-Myers Squibb (BMS) als Brustkrebsmedikament unter dem Namen Ixempra® auf den Markt gebracht werden.^[88] Weitere Beispiele von biologisch aktiven Naturstoffen aus Myxobakterien sind das Lakton Jerangolid A, welches aus *Sorangium cellulosum* isoliert wurde und antifungal wirkt sowie das aus *Chondromyces* sp. isolierte Apicularen A, das eine zytoxische Wirkung und eine

Inhibierung der vakuolären ATPase zeigt. Argyrin F besitzt eine zytotoxische und immunsuppressive Bioaktivität und wurde aus *Archangium gephyra* identifiziert. Außerdem zeigt Argyrin F eine Inhibierung des Proteasoms. Das α -Pyrone Myxopyronin A, das aus *Myxococcus fulvus* isoliert wurde, wirkt antibakteriell und inhibiert die RNA-Polymerase.^[59]

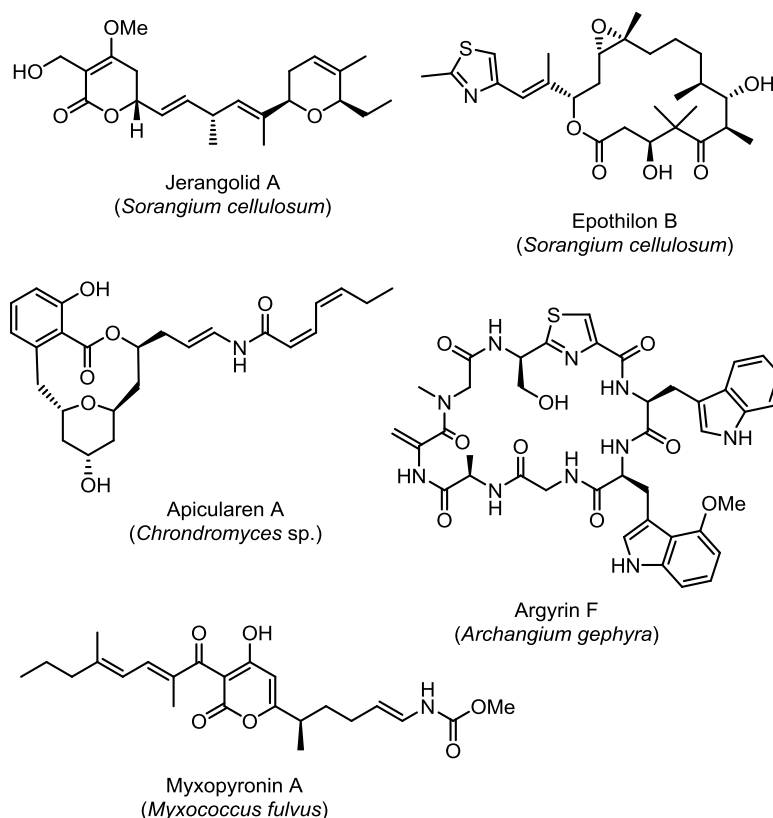


Abbildung 4: Aus Myxobakterien isolierte Naturstoffe.

1.2.1 *Sorangium cellulosum* und daraus isolierte Metaboliten

Etwa die Hälfte der bisher aus Myxobakterien isolierten Sekundärmetabolite werden von dem Genus *Sorangium* produziert (Abbildung 5).^[89] Am Beispiel von *Sorangium cellulosum* So ce12, das zu den *Sorangineae* in der Ordnung *Myxococcales* gehört, kann man die Vielfalt an unterschiedlichen Verbindungsklassen erkennen. Aus diesem Stamm wurden Disorazole, welche destabilisierend auf Tubuline wirken,^[90] Sorangicine, die als Inhibitoren der Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerase dienen,^[91] und antifungale Chivosazole^[92] isoliert.

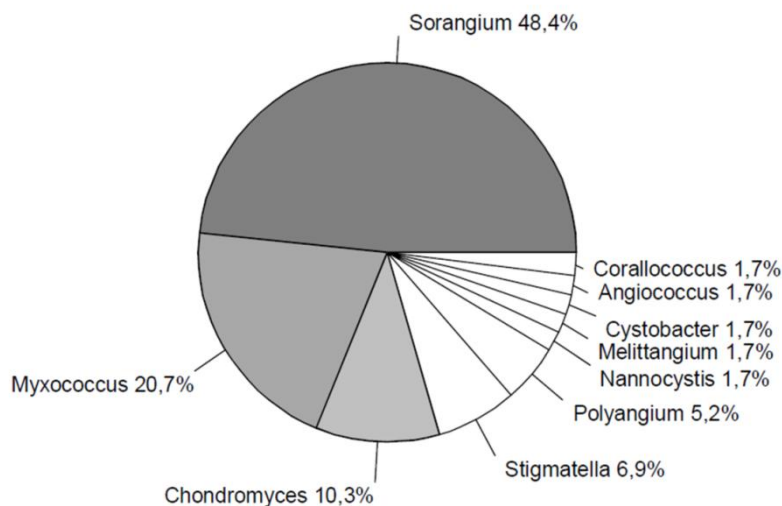


Abbildung 5: Prozentanteil der Myxobakteriengattungen in der Sekundärmetabolitenproduktion.^[77]

Aus dem *S. cellulosum* Stamm So ce90, der 1985 aus einer Bodenprobe von den Ufern des Sambesi aus Südafrika isoliert worden ist,^[93] konnten bisher mehr als 30 verschiedene Epothilone gefunden werden.^[93,94]

1.2.1.1 Spirangiene aus So ce90

Neben den Epothilonen konnten auch die Spirangiene A (1) und B (2) 2005 aus dem *S. cellulosum* Stamm So ce90 isoliert werden (Abbildung 6). Spirangien A (1) zeigte Aktivität gegen ausgewählte Hefen und Pilze (Durchmesser der Inhibierungszonen: *Pichia membranaefaciens* 24 mm, *Rhodotorula glutins* 19 mm, *Botrytis cinerea* 11 mm) und hohe Zytotoxizität gegen L-929-Mausfibroblasten ($IC_{50} = 0.7 \text{ ng mL}^{-1}$). Die Strukturen von Spirangien A und B wurden durch NMR- und MS-Analysen aufgeklärt. Die charakteristischen Strukturelemente sind eine konjugierte Pentaen-Seitenkette (4-H bis 13-H, $\delta_H = 5.35\text{-}6.90 \text{ ppm}$; $\delta_C = 129.2\text{-}134.8 \text{ ppm}$) mit Z-Konfiguration der $\Delta^{4,5}$ -, $\Delta^{8,9}$ - und $\Delta^{12,13}$ -Doppelbindungen und E-Konfiguration der $\Delta^{6,7}$ - und $\Delta^{10,11}$ -Doppelbindungen sowie einer 6,6-Spiroketalstruktur von C-7 zu C-25. Spirangien B unterscheidet sich zu Spirangien A in einer zusätzlichen CH_2 -Gruppe in der linken Seitenkette. Die absolute Konfiguration an C-3 wurde durch chemischen Abbau und anschließender Analyse durch Gaschromatographie bestimmt. Verschiedene NMR-Studien sowie Röntgenkristallographische Untersuchungen des Spiroketalfragments lieferten die relative Konfiguration für C-14 bis C-28.^[95]

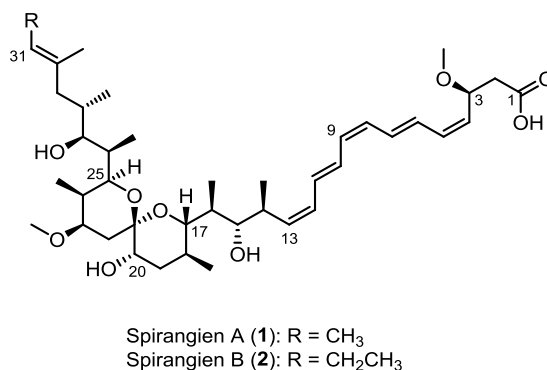
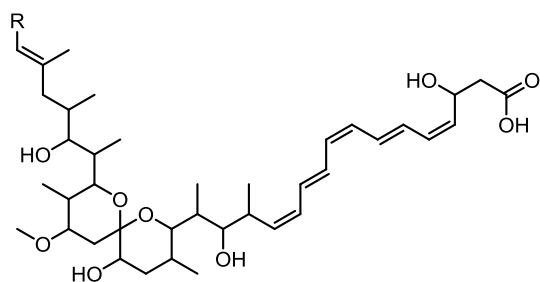


Abbildung 6: Struktur von Spirangien A und B.

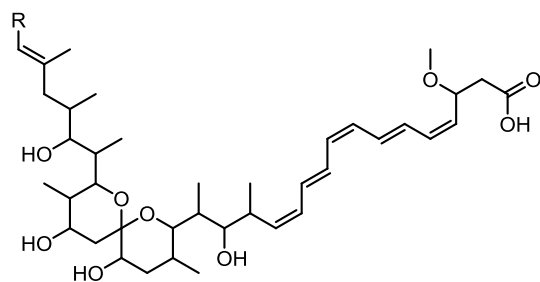
Auf Grund der herausfordernden Struktur und außergewöhnlichen biologischen Aktivität der Spirangiene hat es viele synthetische Beiträge von verschiedenen Forschergruppen^[96,97–99] gegeben und die Totalsynthese von Paterson *et al.*^[97,98] führte abschließend zur Bestätigung der absoluten Konfiguration. Die Spirangiene sind empfindlich gegenüber UV-Licht und Hitze, was eine schonende Aufarbeitung zur Isolierung nötig macht. Erste Studien zum Wirkmechanismus zeigten, dass sie als wirksame Inhibitoren der IL-1/NF-κB vermittelten IL-8 Genexpression angesehen werden können.^[99]

In Genexpressionsuntersuchungen zur Biosynthese von Spirangien durch Typ I Polyketidsynthasen (PKS) in *S. cellulorum* So ce90 konnten Frank *et al.* neue Derivate identifizieren. Durch die Inaktivierung zweier Methyltransferasen wurden eine Reihe neuer Desmethylderivate und durch die Inaktivierung des Cytochrom P₄₅₀-Monooxygenase-kodierten Gens *spiL* azyklische Derivate generiert (Abbildung 7).^[100]

Desmethylderivate



R = CH₃
R = CH₂CH₃



R = CH₃
R = CH₂CH₃

Azyklische Derivate

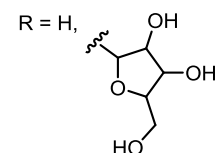
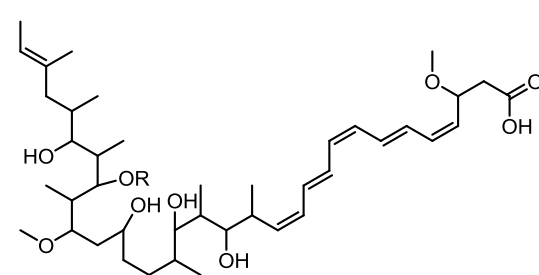


Abbildung 7: Von Frank *et al.* isolierte Spirangienderivate.

Des Weiteren wurden drei zytotoxische Derivate, Spirodienal, Spirodienal B und C aus dem Kulturextrakt des Stammes *S. cellulorum* KM0141, isoliert aus einer Bodenprobe in Ansan (Korea), von Ahn *et al.* und Kwak *et al.* identifiziert (Abbildung 8).^[101] Sie besitzen wie die Spirangiene ein Spiroketal-Grundgerüst und eine Dien-konjugierte Seitenkette mit einer terminalen Aldehydgruppe. Sie zeigen zytotoxische Aktivitäten gegen menschliche Tumorzelllinien mit IC₅₀-Werten von 0.02 bis 875.9 nM.

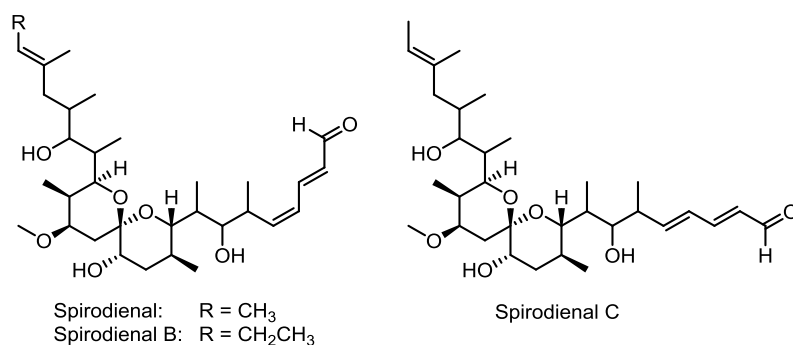


Abbildung 8: Von Ahn *et al.* und Kwak *et al.* isolierte Spirangienderivate.

1.3 Die Murata Methode zur Aufklärung der relativen Stereochemie

Zur Konfigurationsbestimmung von Metaboliten, wie zum Beispiel komplexen Polyketiden, wurden Methoden basierend auf spektroskopischen, computerbasierten, biosynthetischen und synthetischen Verfahren entwickelt.^[102] So ist es möglich, Stereoinformation auch ohne Röntgen-Daten zu erhalten. Zu den NMR-basierten Methoden der Konfigurationsbestimmung gehören, neben Standardtechniken wie Kern-Overhauser-Effekt-(NOE)-Experimenten, in denen die Kopplungen durch den Raum genutzt werden, 2D-*J*-aufgelösten Spektren, Total Correlated Spectroscopy (TOCSY) und homonuklearen Entkopplungen auch die Murata-Methode^[103] und die Kishi-Methode.^[104] Die Kishi-Methode basiert auf dem Vergleich mit einer Datenbank von chiralen Molekülen, speziell von Polyolen. Bei der Murata-Methode wird die konformationelle Analyse basierend auf $^2J_{C,H}$, $^3J_{C,H}$ und $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstanten durchgeführt. Während vicinale Kopplungskonstanten von Homo- und Heterokernen der Karpluskurve folgen, können ebenso auch geminale Kohlenstoff-Protonen-Kopplungskonstanten Information zur Konfiguration liefern. Ist eine Sauerstofffunktion an einem Kohlenstoffatom *gauche* zu seinem geminalen Proton ausgerichtet, wird die $^2J_{C,H}$ -Kopplungskonstante groß, bei einer *anti*-Ausrichtung wird der Wert klein (Abbildung 9).

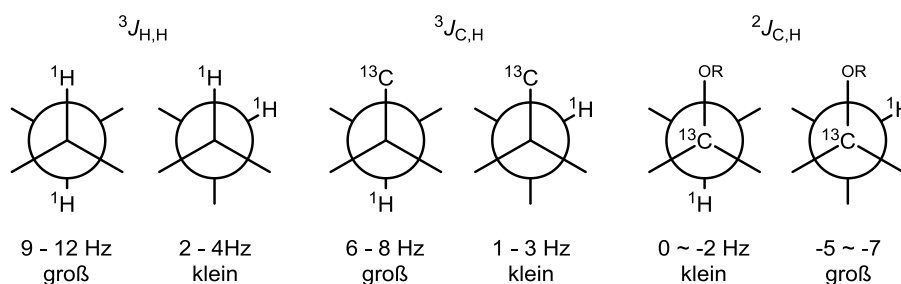


Abbildung 9: Diederwinkelabhängige Kopplungskonstanten $^3J_{H,H}$, $^3J_{C,H}$ und $^2J_{C,H}$.

Für die NMR-Messung wird ein HSQC-HECADE-Experiment durchgeführt.^[105] Das Spektrum ähnelt dem eines HMBC-Spektrums auf dem das 1H -NMR auf der einen und das ^{13}C -NMR auf der anderen Achse aufgetragen sind (Abbildung 10).

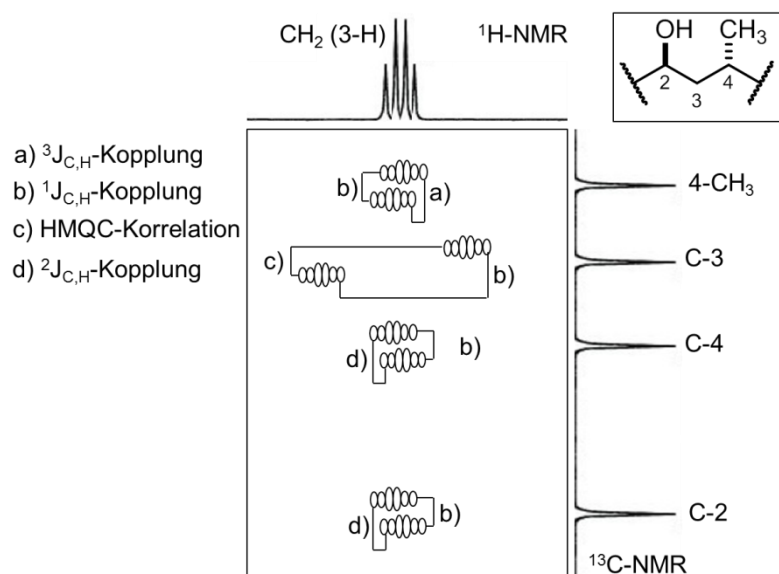


Abbildung 10: Beispiel eines HSQC-HECADE Spektrums: (a) $^3J_{C,H}$ = Kopplung zwischen Methylenproton 3-H und Methylenkohlenstoff 4-CH₃; (b) $^1J_{C,H}$ = Kopplung zwischen Methylenproton 3-H und Methylenkohlenstoff C-3 (typischerweise 150 Hz); (c) HMQC-Korrelation; (d) $^2J_{C,H}$ = Kopplung zwischen Methylenproton 3-H und Methinkohlenstoff C-4; (e) $^2J_{C,H}$ = Kopplung zwischen Methylenproton 3-H und oxidiertem-Methinkohlenstoff C-2.^[106]

Jedes Korrelationssignal ist in zwei Signale aufgespalten, wobei der horizontale Abstand die $^2J_{C,H}$ - $^3J_{C,H}$ -Kopplungskonstanten widerspiegelt und die vertikale Distanz die $^1J_{C,H}$ -Kopplungskonstante repräsentiert. $^3J_{C,H}$ -Kopplungskonstanten haben positive Werte, während $^2J_{C,H}$ -Kopplungskonstanten generell negative Werte annehmen. Ein Vorteil der Murata-Methode ist die Bestimmung der relativen Konfiguration von vicinalen Stereozentren ohne die entsprechenden Isomere synthetisieren zu müssen. Sie kann auf sowohl auf lineare Polyketide als auch auf Makrolide angewendet werden.^[102,107]

1.4 Dereplikation bekannter Naturstoffe

In der Suche nach neuen Naturstoffen ist es wichtig, schon bekannte Verbindungen frühzeitig im Isolierungsprozess zu identifizieren, um Zeit, Aufwand und Kosten zu minimieren.^[108] Dieser Prozess ist auch als Dereplikation bekannt. Häufig angewandte Methoden sind dabei gekoppelte HPLC-Verfahren, wie zum Beispiel HPLC-MS, HPLC-NMR, HPLC-NMR-MS und HPLC-SPE-NMR.^[109] Aber auch bioaktive sogenannte „Fingerprints“, wie zum Beispiel zellbiologische Analysen oder BioMAP^[110] werden oft genutzt. Die Gemeinsamkeit aller Methoden liegt in der Untersuchung auf Übereinstimmungen isolierter Verbindungen zu schon bekannten bezüglich UV/Vis-Spektren, Retentionszeiten bei chromatographischen Anwendungen, Massen- und NMR-

Spektren sowie biologischen Aktivitäten. Die Massenspektrometrie ist dabei deutlich empfindlicher als die NMR-Spektroskopie. Jedoch ist es in der Regel schwieriger den Naturstoff nur durch einen einzelnen Massepeak zu identifizieren, da in Datenbanken wie AntiBase,^[111] MarinLit,^[112] Beilstein Dictionary of Natural Products^[113] und SciFinder eine hohe Anzahl von Ergebnissen erhalten wird. Auch wenn viele charakteristische Merkmale eines Naturstoffs während der Isolierung experimentell bestimmt werden können, wird die komplette Strukturaufklärung dennoch erst mit dem Erhalt der Reinsubstanz nach Beendigung des Isolierungsprozesses erreicht. Somit müssen Strategien zur Dereplikation weiterentwickelt werden, um Naturstoffe so früh wie möglich als schon bekannte Verbindungen identifizieren zu können.

Ein Beispiel für eine derartige neue Dereplikationsmethode ist der Einsatz einer LC-UV-MS-Methode, die Nielsen *et al.* verwendete.^[114] Mit Hilfe der UV-Spektroskopie, in Verbindung mit präzisen Massenbestimmungen der Addukte und Fragment-Ionen durch hochauflösende orthogonale Time-of-Flight-Massenspektrometrie, konnten bekannte und neue Pilzmetaboliten und Mykotoxine aus Kulturextrakten identifiziert werden. Ebenso konnte die Gruppe von El-Elimat *et al.* durch die Anwendung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit einer Photodiodenzeile und einer hochauflösenden Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-PDA-HRMS-MS/MS), eine Methode zur Dereplikation von Pilz-Sekundärmetaboliten entwickeln.^[115] Dabei sind die MS/MS-Fragmentierungen charakteristischer für einen Naturstoff als nur der einzelne Molekülpeak. Auch ein Ansatz einer Metabolom-basierten Verwendung der Massenspektrometrie zur Entdeckung neuer Sekundärmetaboliten aus mikrobiellen Quellen konnte durch Krug *et al.* aufgezeigt werden.^[116] Die Arbeitsgruppe von Gerwick *et al.* entwickelte ebenfalls eine neue Methode zur schnellen Dereplikation aus komplexen biologischen Extrakten mit Hilfe der Massenspektrometrie.^[117] Dabei werden MS/MS-Daten sowohl von den einzelnen Verbindungen aus dem Extrakt als auch von schon bekannten isolierten oder synthetisierten Naturstoffen, die als Standard dienen, benötigt. Basierend auf dem MS/MS-Datenvergleich kann unter Zuhilfenahme eines Computerprogramms ein molekulares Network erzeugt werden, in dem aus einer komplexen Mischung von Verbindungen nicht nur bekannte Substanzen identifiziert werden können, sondern auch ein Überblick über strukturell verwandte Naturstoffe verschafft werden kann. Über die Methode im Einzelnen und deren Anwendung wird im Abschnitt 5 genauer eingegangen. Auch Liu *et al.* verwendete die Methode des

MS/MS-basierten molekularen Networks in Kombination mit Genominformationen zur Identifizierung von Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces roseosporus*.^[118] Nguyen *et al.* publizierten 2013 die MS/MS-Methode in Verbindung mit dem MS/MS-Network und Peptidgenomik in großem Maßstab, in dem das Metabolitenprofil von 60 Mikroorganismen gleichzeitig analysiert wurde.^[119]

1.5 Targetsuche von Wirkstoffen

Bei der Untersuchung von Struktur-Wirkmechanismen von Wirkstoffen spielt auch die Identifikation des Zielproteins, des Targets, eine bedeutende Rolle. Der klassische Weg der Targetsuche ist hierbei die affinitätsbasierte Aufreinigung durch einen Pulldown-Assay (Abbildung 11).^[120] Die Testsubstanz wird hierfür auf einem Trägermaterial immobilisiert und anschließend mit zellulären Proteinextrakten inkubiert, wobei die Zielproteine mit der Substanz in der Regel eine nichtkovalente Bindung eingehen (Abbildung 11, oberer Weg). Durch mehrere Waschschrte werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Unter geeigneter Elution oder durch Erhitzen wird die Bindung spezifisch gebundener Proteine mit der Substanz gelöst und nach Größenauftrennung durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und proteolytischem Verdau mit Trypsin^[121] aufgetrennt. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse und Abgleich mit einer Proteindatenbank kann das Zielprotein identifiziert werden. Eine zweite Möglichkeit ist die zusätzliche Zugabe der unmodifizierten Substanz, um eine Konkurrenzbindung zu erreichen (Abbildung 11, unterer Weg).

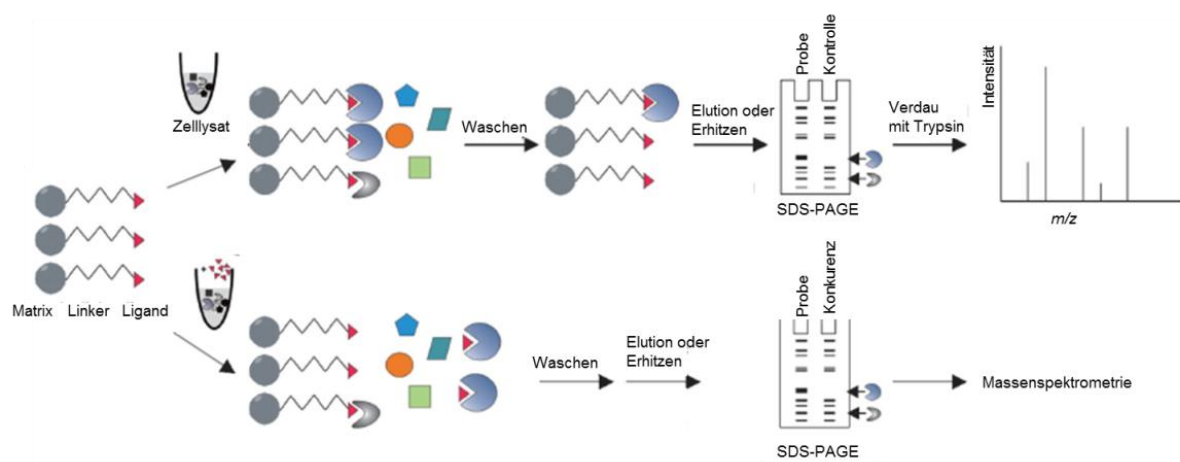


Abbildung 11: Affinitätsbasierte Targetsuche.^[122]

Um generell dieses Pulldown-Experiment durchführen zu können, muss zunächst die Substanz mit einem funktionellen Tag modifiziert werden, um die Immobilisierung auf einer Matrix zu ermöglichen. Außerdem muss ein Linker zwischen der Substanz und dem funktionellen Tag synthetisch in die Struktur eingebracht werden, so dass die Substanz-Target-Interaktion nicht durch sterische Wechselwirkungen beeinträchtigt wird. In einigen Varianten der Affinitätschromatographie wird zusätzlich noch ein Photoaffinitätsmarker oder/ und ein Fluorophor eingebaut (Abbildung 12, A). In der Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) wird durch die zusätzliche Reaktionsfunktion des Photoaffinitäts-Tag die Ausbildung einer kovalenten Bindung innerhalb des aktiven Zentrums des Zielproteins ermöglicht (Abbildung 12, B).^[123] Dadurch werden schwache nichtkovalente Interaktionen in kovalente Bindungen überführt und erlauben auch hartnäckige Waschbedingungen, um unspezifische Proteine zu entfernen.

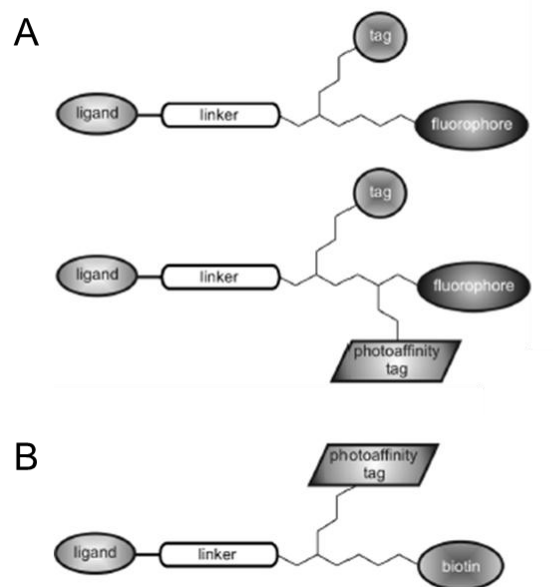


Abbildung 12: Modifizierte Strukturen für die Targetsuche, A: Trifunktionelle Strukturen, B: Struktur für die Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS).^[122]

Eine weitere Methode in der Targetsuche ist die Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Methode dient der Analyse der Proteinexpression, um Informationen über die Proteinfunktionen, Interaktionspartner und die Rolle in zellulären Prozessen zu erhalten.^[124] Sie kann aber auch Aufschluss über die Lokalisierung der untersuchten Substanz in der Zelle geben. Die gewünschten Zellen werden mit der Substanz inkubiert, anschließend fixiert, permeabilisiert und angefärbt (Abbildung 13).

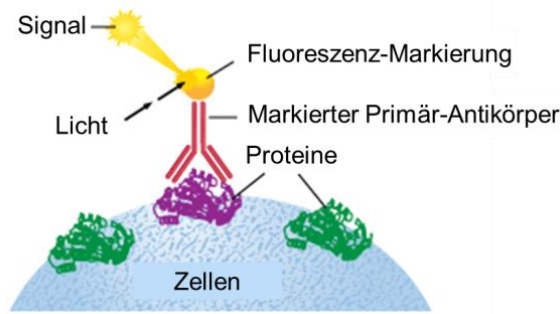


Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Methode.^[125]

Dabei werden spezifische Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Je nach Antikörper können Tubulin, Aktin, die Zellkerne und die zu lokalisierenden Substanzen in verschiedenen Farben (rot, grün, blau) angefärbt werden. Mit Hilfe eines Mikroskops, das mit einer speziellen Lichtquelle ausgestattet ist, kann das fluoreszierende System angeregt und durch die Emission sichtbar gemacht werden. Zur Fluoreszenzmarkierung können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden (Abbildung 14).

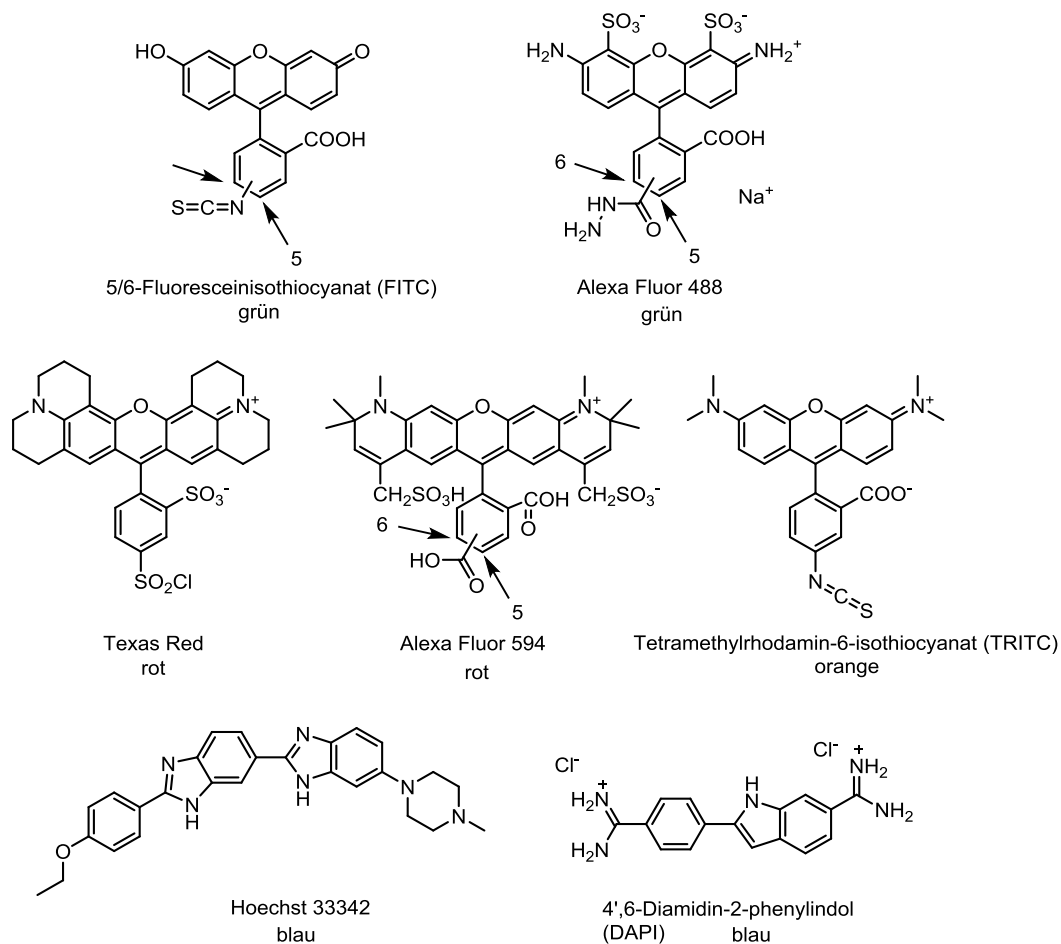


Abbildung 14: Fluoreszenzfarbstoffe.

Die meisten Farbstoffe leiten sich von Rhodamin ab, wie zum Beispiel Alexa Fluor-, Tetramethylrhodamin-6-isothiocyanat (TRITC)- und Texas Red- Farbstoffe, während 5/6-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ein Fluoresceingrundgerüst aufweist. Die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) besitzen eine Benzimidazol- bzw. Indol-Grundstruktur. Hoechst 33342 und DAPI werden eingesetzt, um DNA anzufärben. Die anderen Farbstoffe können je nach Modifikation verschiedene Zellbestandteile anfärben.

2 Aufgabenstellung

Der epiphytische bakterielle Stamm IBlü-4 und die Hefe H24 sollten auf ihre metabolische Vielfalt hin untersucht werden. Die Analyse sollte dem Auffinden neuer, biologisch aktiver Substanzen dienen, die für medizinische Anwendungen eingesetzt werden könnten. Dabei sollten die biologisch aktiven Wirkstoffe isoliert, charakterisiert und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie deren chemische Struktur aufgeklärt werden. Um den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Produktion von Sekundärmetaboliten zu untersuchen, sollte zusätzlich eine Kokultivierung des *Bacillus cereus*-Stammes IBlü-4 mit der Hefe H24 auf Wirkstoffe untersucht werden. Des Weiteren sollte von dem zyklischen Hexapeptid Baceridin ein sogenannter Alanin-Scan durchgeführt werden, um eine Auswirkung auf die Aktivität festzustellen bzw. den für die Aktivität verantwortlichen Aminosäurerest zu identifizieren.

Außerdem sollte auf Grund der beeindruckenden Zytotoxizität der Spirangiene die Kulturbrühe aus einer Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 im 12 L- und einer 70 L-Maßstab aufgearbeitet und neue Derivate isoliert werden. In Bezug auf die Wirkungsweise von Spirangien sollten Studien zur Targetsuche von Spirangien A durchgeführt werden. Dies sollte mit Hilfe von Lokalisierungsstudien und Pulldown-Assays realisiert werden.

In Verbindung mit einem Auslandsaufenthalt am Scripps Institut für Ozeanographie (SIO, La Jolla, San Diego) sollte in der Arbeitsgruppe Gerwick eine neue Methode zur Dereplikation von Naturstoffen auf der Basis von MS und MS/MS-Daten entwickelt und angewendet werden.

3 Sekundärmetaboliten aus *B. cereus* und *M. pulcherrima*

3.1 Isolierung der Reinsubstanzen

Die Fermentationen der Stämme erfolgte unter dem Einsatz von neutralem polymeren Adsorberharz (Amberlite XAD-16; 2%). Die Verwendung dieses Harzes erwies sich bei der Isolierung von Sekundärmetaboliten als effizient, da der aufwendige Prozess von kontinuierlicher Extraktion der Kulturbrühe mit literweise organischen Lösungsmitteln und die energieaufwändige Entfernung des Lösungsmittels durch eine einmalige Filtration der Kultur und die Elution des Harzes (2%) mit Methanol ersetzt wird. Dies bringt nicht nur viele ökonomische und ökologische Vorteile, sondern auch eine erhöhte Produktion von Sekundärmetaboliten des jeweiligen Stammes mit sich. Die Anzuchten wurden von I. Reupke (Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt. Zur Trennung des XAD-Harzes vom Medium wurde die Kultur über ein Sieb filtriert und mit Wasser gewaschen. Nachdem keine Schaumbildung mehr eintrat, wurde das Filtrat in 50 mL Falcon-Tubes überführt und bei längerer Lagerung bei -20 °C eingefroren. Um die Metaboliten aus dem Harz zu gewinnen, wurde das XAD-Harz in eine Fritte (4 x16 cm), die mit einer etwa 2 cm dicken Schicht Seesand gefüllt war, überführt und mit verschiedenen Lösungsmitteln eluiert. Die aufgefangenen Eluate wurden zum Lichtausschluss in lichtundurchlässigen Kolben aufbewahrt und bei -20 °C gelagert. Die Extrakte, die nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhalten wurden, wurden mit Ethylacetat und Wasser ausgeschüttelt, um polare Substanzen wie zum Beispiel Salze abzutrennen. Der Rückstand der Ethylacetatphase wurde in Methanol aufgenommen und mit Heptan ausgeschüttelt, um Lipide zu entfernen. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erfolgte die weitere Aufreinigung des Rohextraktes durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel und/ oder RP-HPLC. Zur Analyse mittels einer analytischen UV/Vis-gekoppelten RP-HPLC wurde der Gradient A verwendet (siehe Experimenteller Teil).

3.1.1 Isolierung aus *B. cereus* (IBlü-4, 4 L-Kultur)

Das XAD-Harz einer 4 L-Kultur des Stammes *Bacillus cereus* (IBlü-4), einem Isolat von *Arabidopsis thaliana*, wurde mit vier Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität eluiert (2 x100 mL THF, 2 x100 mL CH₂Cl₂, 2 x100 mL Ethylacetat, 5 x100 mL MeOH). Die jeweiligen Eluate wurden zur ersten Einschätzung der enthaltenen Metaboliten mittels einer analytischen UV/Vis-gekoppelten HPLC analysiert sowie auf Aktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Beim THF-Eluat sowie beim CH₂Cl₂-Eluat konnte eine klare Lysis bei *Bacillus subtilis* beobachtet werden (Hemmhofdurchmesser: THF-Eluat: 1.5 cm, CH₂Cl₂-Eluat: 1.0 cm). Gegen *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* konnte bei keinem der Eluate eine Hemmung festgestellt werden.

3.1.1.1 Aufarbeitung des THF-Eluats

Aus 75 mL des THF-Eluats (200 mL) konnten 355.4 mg Rohextrakt (A1-1 I) erhalten werden (Abbildung 15). Nach der Reinigung durch eine Säulenchromatographie (3 x15 cm; Eluenten: CH₂Cl₂/MeOH; von 20:1, auf 15:1, auf 10:1, auf 1:10) konnten 13 Fraktionen (A1-05 bis A1-16) erhalten werden, wobei es sich bei drei von ihnen um Mischfraktionen handelte. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit einer analytischen HPLC untersucht. Bei der Fraktion A1-05 handelte es sich um Butylhydroxytoluol (BHT), welches als Stabilisator für THF dient.

Um jeweils eine ausreichende Menge von den einzelnen Fraktionen zur Reinigung und Analyse zu erhalten, wurde der Extrakt (A1-1 II, 382.3 mg) von weiteren 75 mL des THF-Eluats säulenchromatisch an Kieselgel aufgetrennt (3 x15 cm; Eluenten: CH₂Cl₂/MeOH; von 20:1, auf 15:1, auf 10:1, auf 1:10). Durch eine anschließende Untersuchung mit analytischer HPLC konnten die Fraktionen den entsprechenden Fraktionen aus der säulenchromatographischen Trennung von A1-1 I zugeordnet werden. Die Fraktionen A1-14 und A1-14.1, A1-15 und A1-15.1 sowie A1-16 und A1-16.1 wurden vereinigt, um sie mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC weiter aufzureinigen.

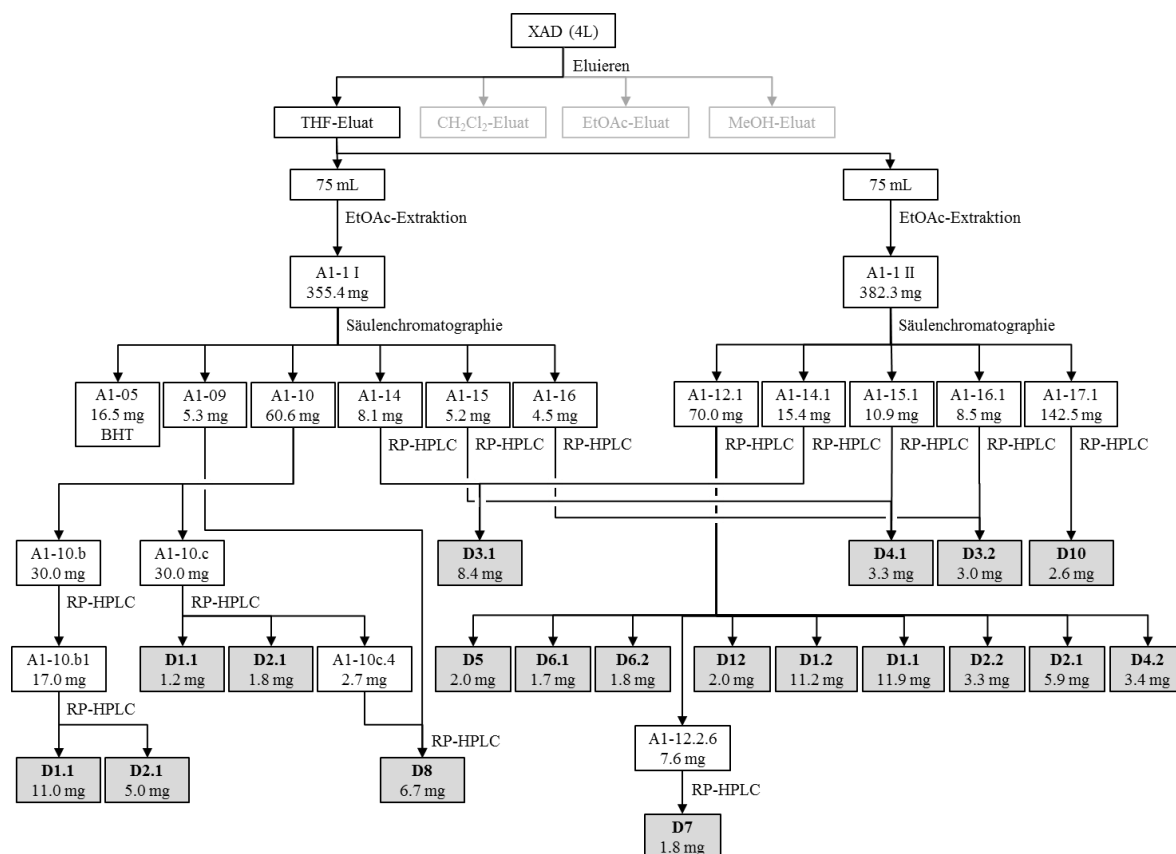


Abbildung 15: Fließschema der Aufreinigung des THF-Eluats aus IBlü-4 (4 L-Kultur).

Bei der Untersuchung der Fraktion A1-10 (60.6 mg), die mittels analytischer HPLC durchgeführt wurde, konnten drei Hauptverbindungen beobachtet werden, die mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC aufgereinigt wurden (Gradient: 20% B für 35 min, 25% B für 10 min, 35% B für 20 min, 40% B für 25 min, 80% B für 15 min). Dazu konnten aus ca. 30 mg der Probe (A1-10.b) vier Hauptpeaks erhalten werden. Das analytische HPLC-Chromatogramm der Hauptfraktion (A1-10b.1) konnte zeigen, dass es sich um zwei Verbindungen handelt. Die Fraktion wurde mit Hilfe einer weiteren präparativen RP-HPLC aufgetrennt (Gradient: 10% B für 25 min, 20% B für 27 min, 25% B für 8 min) und ergab Diketopiperazin **D1.1** (11 mg, t_R = 41 min) und **D2.1** (5 mg, t_R = 54 min). Die verbliebenen 30 mg der Fraktion A1-10 (A1-10.c) wurden ebenfalls mit einer präparativen HPLC aufgetrennt (Gradient: 20% B für 30 min, 25% B für 10 min, 35% B für 25 min, 40% B für 7 min, 60% B für 25 min, 80% B für 18 min). Bei zwei Fraktionen handelte es sich nach Analyse mittels analytischer HPLC um die beiden schon isolierten Naturstoffe **D1.1** und **D2.1**. Das Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion A1-10c.4 (2.7 mg) wies eine ähnliche Retentionszeit und ein identisches UV-Spektrum wie das von A1-09, daher wurden die beiden Fraktionen A1-09 und A1-10c.4 vereinigt

und die erhaltene Menge von 8.0 mg mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC weiter aufgereinigt. Die RP-HPLC (Gradient: 50% B für 20 min, 60% B für 25 min, 80% B für 15 min) ergab 6.7 mg von Verbindung **D8** ($t_R = 35$ min).

Zur Aufreinigung der beiden vereinigten Fraktionen A1-14 und A1-14.1 (zusammen 23.5 mg) wurde eine RP-HPLC durchgeführt (Gradient: 5% B für 12 min, 10% B für 43 min, 15% B für 15 min). Es konnten 8.4 mg von Verbindung **D3.1** ($t_R = 42$ min) erhalten werden.

Um die vereinigten Fraktionen A1-15 und A1-15.1 aufzureinigen, wurden die gesamten 16.1 mg mit Hilfe einer RP-HPLC getrennt (Gradient: 20% B für 52 min, 30% B für 13 min, 35% B für 20 min). Die Aufreinigung ergab Diketopiperazin **D4.1** in 3.3 mg ($t_R = 32$ min).

Zur Aufreinigung der beiden vereinigten Fraktionen A1-16 und A1-16.1 (zusammen 13.0 mg) wurde eine RP-HPLC durchgeführt (Gradient: 5% B für 15 min, 10% B für 43 min, 50% B für 18 min). Dabei konnten 3.0 mg von Verbindung **D3.2** ($t_R = 46$ min) erhalten werden.

Die Hauptkomponenten der Fraktion A1-12.1 wurden in zwei RP-HPLC-Läufen aufgetrennt (Gradient: 5% B für 18 min, 10% B für 54 min, 15% B für 45 min, 30% B für 23 min). Die Verbindungen **D5** (2.0 mg, $t_R = 52$ min), **D6.1** (1.7 mg, $t_R = 61$ min), **D6.2** (1.8 mg, $t_R = 68$ min), **D12** (2.0 mg, $t_R = 72$ min), **D1.2** (11.2 mg, $t_R = 94$ min), **D1.1** (11.9 mg, $t_R = 97$ min), **D2.2** (3.3 mg, $t_R = 116$ min), **D2.1** (5.9 mg, $t_R = 122$ min) und **D4.2** (3.4 mg, $t_R = 124$ min) konnten erhalten werden. Nach der Aufreinigung der Fraktion A1-12.2.6 ($t_R = 88$ min, 7.6 mg) mittels einer weiteren RP-HPLC (Gradient: 5% B für 12 min, 10% B für 13 min, 15% B für 25 min, 20% B für 20 min) konnte Verbindung **D7** (1.8 mg, $t_R = 58$ min) erhalten werden.

Zur weiteren Aufreinigung der Fraktion A1-17.1 (142.5 mg), die durch Spülen mit CH₂Cl₂/Methanol (5:95) aus der zweiten säulenchromatischen Trennung des aufgearbeiteten THF-Eluats gewonnen wurde, wurde ein Teil der Probe mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC aufgetrennt (Gradient: 20% B für 40 min, 40% B für 15 min, 50% B für 25 min). Die Aufreinigung ergab Tetrapeptid **D10** (2.6 mg, $t_R = 29$ min).

3.1.1.2 Aufarbeitung des Dichlormethan-Eluats

Aus 70 mL des CH₂Cl₂-Eluat (200 mL) konnten 62.3 mg Rohextrakt (A1-2) gewonnen werden (Abbildung 16). Ein Drittel der Menge wurde mit Hilfe einer RP-HPLC weiter aufgearbeitet (Gradient: 5% B für 10 min, 10% B für 15 min, 20% B für 25 min, 25% B für 20 min, 30% B für 10 min, 40% B für 15 min, 60% B für 12 min, 80% B für 15 min). Dabei konnten Verbindung **D1.1** (0.4 mg, $t_R = 52$ min), **D2.2** (0.4 mg, $t_R = 56$ min) und **D2.1** (0.8 mg, $t_R = 63$ min), erhalten werden. Da die Verbindungen bekannt sind und schon aus dem THF-Eluat isoliert wurden, wurden diese nicht weiter untersucht.

3.1.1.3 Aufarbeitung des Ethylacetat-Eluats

Zur ersten Einschätzung der enthaltenen Metaboliten wurde der Extrakt (A1-3a, 9.9 mg) von 25 mL des Ethylacetat-Eluats mit Hilfe einer HPLC-MS analysiert (Abbildung 16). Zur Isolierung der Metaboliten wurden aus den restlichen 175 mL Eluat 16.9 mg Rohextrakt gewonnen (A1-3) und mittels einer präparativen RP-HPLC weiter aufgereinigt (Gradient: 20% B für 27 min, 40% B für 20 min, 60% B für 15 min, 80% B für 20 min). Es konnten die Verbindungen **D7** (2.0 mg, $t_R = 22$ min), **D1.1** (1.7 mg, $t_R = 26$ min), **D2.2** (0.8 mg, $t_R = 27$ min) und **D2.1** (1.6 mg, $t_R = 36$ min), erhalten werden.

3.1.1.4 Aufarbeitung des Methanol-Eluats

Aus 25 mL Methanol-Eluat konnten 6.0 mg Rohextrakt (A1-4a) erhalten werden, der mittels einer HPLC-MS untersucht wurde (Abbildung 16). Der Extrakt der restlichen 475 mL des Eluats (A1-4, 51.8 mg) wurde mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC in zwei Läufen weiter aufgereinigt (Gradient: 20% B für 5 min, von 20 auf 40% B in 5 min, 40% B für 5 min, von 40 auf 60% B in 15 min, von 60 auf 100% B in 5 min, 100% B für 10 min). Dabei konnte das Tetrapeptid **D10** (3.0 mg, $t_R = 19.9$ min) isoliert werden.

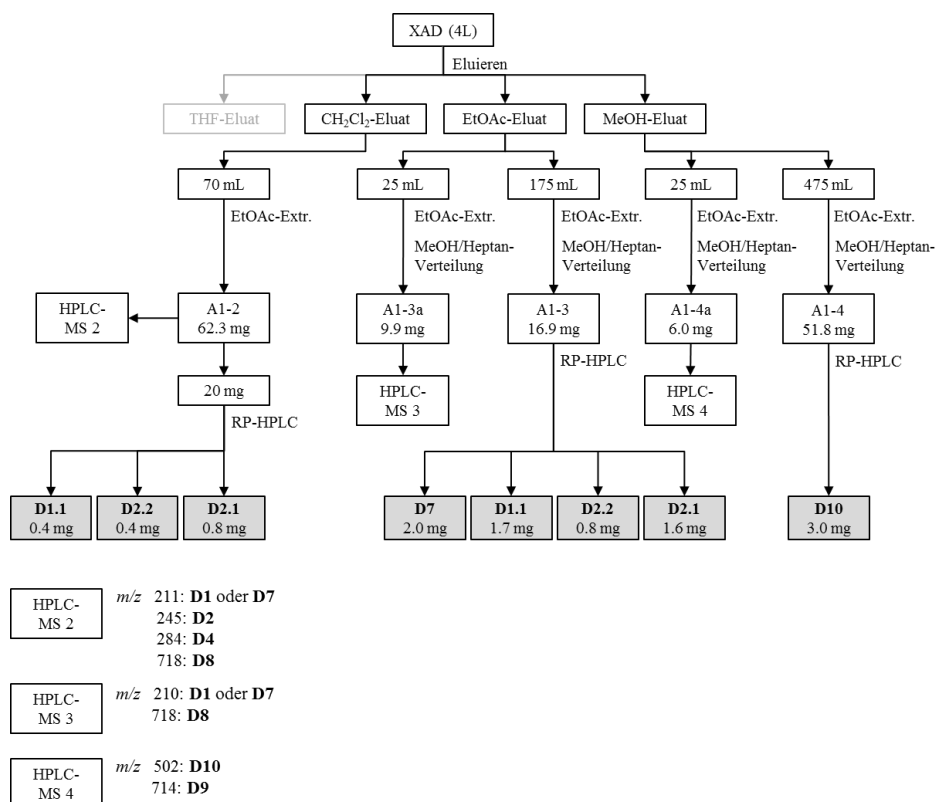


Abbildung 16: Fließschema der Aufreinigung des Dichlormethan-, Ethylacetat- und Methanol-Eluats aus IBlü-4 (4 L-Kultur).

3.1.2 Isolierung aus *M. pulcherrima* (H24, 1 L-Kultur)

Bei dem zu untersuchenden Stamm H24 handelte es sich um *Metschnikowia pulcherrima*, eine epiphytische Hefe, die eine starke Wachstumshemmung gegen *Bacillus subtilis* im Rahmen des Screening auf antagonistische Aktivitäten gegen *Venturia inaequalis* gezeigt hat. Das XAD-Harz einer 1 L-Kultur von H24 wurde mit Methanol (5 x40 mL) und Aceton (3 x40 mL) eluiert (Abbildung 17). Der Rohextrakt aus dem Methanol-Eluat (A3-1a, 174.4 mg) wurde mittels einer präparativen RP-HPLC getrennt (Gradient: 10% B für 5 min, von 10 auf 25% B in 10 min, von 25 auf 60% B in 20 min, von 60 auf 100% B in 10 min, 100% B für 5 min). Dabei wurden eine Mischung aus Verbindung **D1** und **D2** (6.8 mg, 2:1, t_R = 24.0 min), Verbindung **D2** (3.0 mg, t_R = 26.4 min), **D4** (1.6 mg, t_R = 27.6 min), **D14** (0.5 mg, t_R = 30.6 min) und **D13** (3.0 mg, t_R = 31.6 min) isoliert.

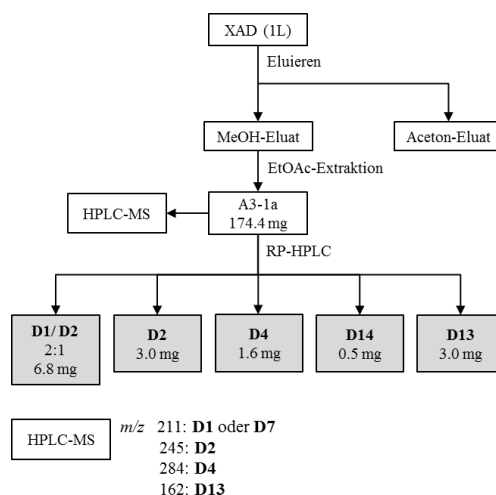


Abbildung 17: Fließschema der Aufreinigung einer 1 L-Kultur von H24.

3.1.3 Isolierung aus einer Kokultur von *B. cereus* und *M. pulcherrima* (IBlü-4/ H24, 1 L-Kultur)

Bei dem zu untersuchenden Isolat handelte es sich um eine Kokultur von Stamm *Bacillus cereus* (IBlü-4) mit dem Stamm *Metschnikowia pulcherrima* (H24). Das XAD-Harz einer 1 L-Kultur wurde mit Methanol (4 x 50 mL) und Aceton (3 x 50 mL) eluiert (Abbildung 18). Aus dem Methanol-Eluat konnten 186.8 mg Rohextrakt (A4-1a) erhalten werden, der mittels einer HPLC-MS analysiert wurde.

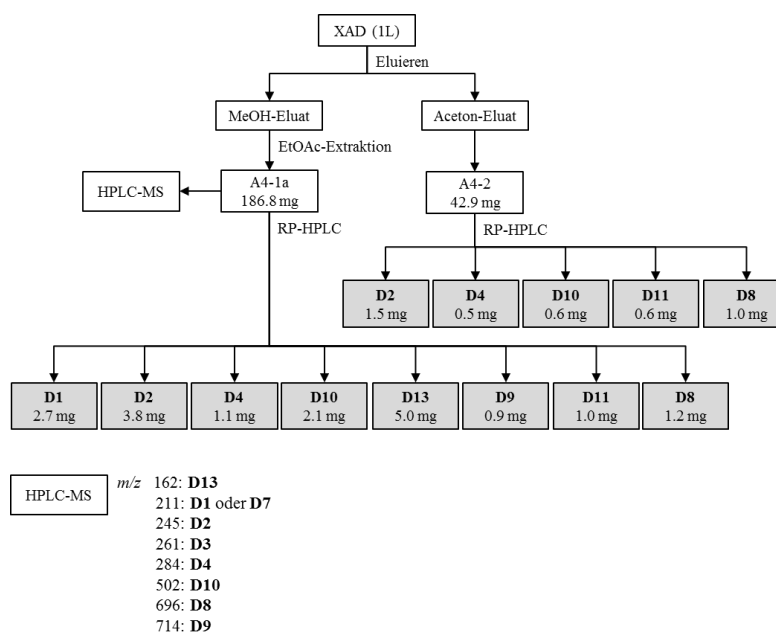


Abbildung 18: Fließschema der Aufreinigung einer Kokultur aus IBlü-4 und H24 (1L-Kultur).

Der Rohextrakt (A4-1a) wurde zur Isolierung der Metaboliten mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC getrennt (Gradient 1, siehe Experimenteller Teil). Dabei konnten der Naturstoff **D1** (2.7 mg, $t_R = 21.5$ min), **D2** (3.8 mg, $t_R = 22.2$ min), **D4** (1.1 mg, $t_R = 22.7$ min), **D10** (2.1 mg, $t_R = 23.8$ min), **D13** (5.0 mg, $t_R = 25.8$ min), **D9** (0.9 mg, $t_R = 27.5$ min), **D11** (1.0 mg, $t_R = 34.0$ min) und **D8** (1.2 mg, $t_R = 35.9$ min) isoliert werden. Aus dem Rückstand des Aceton-Eluats (A4-2, 42.9 mg) konnten über eine präparative RP-HPLC (Gradient 1, siehe Experimenteller Teil) die auch schon aus dem Methanol-Eluat isolierten Verbindungen **D2** (1.5 mg, $t_R = 21.0$ min), **D4** (0.5 mg, $t_R = 22.6$ min), **D10** (0.6 mg, $t_R = 23.5$ min), **D11** (0.6 mg, $t_R = 34.4$ min) und **D8** (1.0 mg, $t_R = 35.8$ min) erhalten werden.

3.1.4 Isolierung aus *B. cereus* (1 L-Kultur)

Verbindung **D11**, die der aus dem *B. cereus*-Stamm isolierten Verbindung **D8** (Baceridin, literaturbekannt) strukturell ähnlich ist (wird in Abschnitt 3.3.4 diskutiert), konnte nur aus der Kokultur isoliert werden (Abschnitt 3.1.3). Es sollte kontrolliert werden, ob Verbindung **D11** auch vom Stamm *B. cereus* produziert wird. Da die 4 L-Kultur aus Abschnitt 3.1.1 und die Kokultur unterschiedlich aufgearbeitet wurden und somit andere Aufarbeitungsbedingungen herrschten, wurde eine neue 1 L Schüttelkultur von *B. cereus* angezogen und die Kulturbrühe unter gleichen Bedingungen wie die Kokultur aufgereinigt. Dabei lag der Fokus auf der Isolierung von Verbindung **D11**. Außerdem konnte von dem Rohextrakt eine HPLC-MS-Analyse durchgeführt werden, um die Produktion von Metaboliten mit der Kokultur vergleichen zu können. Das XAD-Harz der 1 L-Kultur wurde mit Methanol (4 x50 mL) und Aceton (3 x50 mL) eluiert (Abbildung 19).

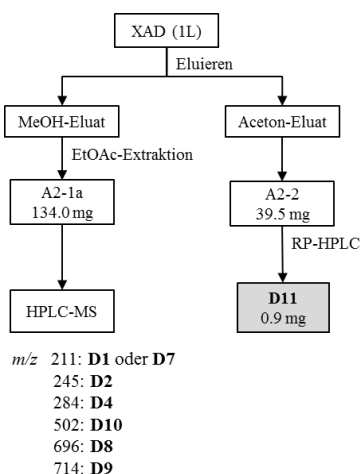


Abbildung 19: Fließschema der Aufreinigung einer 1 L-Kultur von IBLü-4.

Nach Entfernen des Lösungsmittels des Aceton-Eluats unter vermindertem Druck wurde der Rückstand (A2-2, 39.5 mg) mit einer präparativen RP-HPLC aufgereinigt (Gradient 1, siehe Experimenteller Teil). Das ^1H -NMR des bei 35.7 min erhaltenen Peaks (0.9 mg) wurde mit dem ^1H -NMR von der aus der Kokultur isolierten Verbindung **D11** verglichen. Die Übereinstimmung der Spektren konnte Verbindung **D11** als gebildeter Metabolit von *B. cereus* bestätigen. Dass der Naturstoff in der ersten IBLü-4-Kultur (4 L) aus Teil 3.1.1 nicht isoliert wurde, könnte an den unterschiedlichen Eluierungsmethoden bei der Aufarbeitung liegen, wodurch sich Verbindung **D11** in mehreren Eluaten befunden haben könnte und die Mengen nach der Reinigung zu gering waren. Der Vergleich der Bildung von Verbindung **D11** in IBLü-4 und H24 wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

3.1.5 Vergleich Metabolitenproduktion zwischen IBLü-4, H24 und Kokultur

Um die Produktion der Metaboliten zwischen den Kulturen aus IBLü-4, H24 und der Kokultur vergleichen zu können, sind die einzelnen UV-Chromatogramme der HPLC-MS-Messungen sowie die Zuordnung der isolierten Substanzen zu den Peaks in Abbildung 20 dargestellt. Ein besonderer Fokus lag dabei auf dem literaturbekannten Baceridin (**D8**).

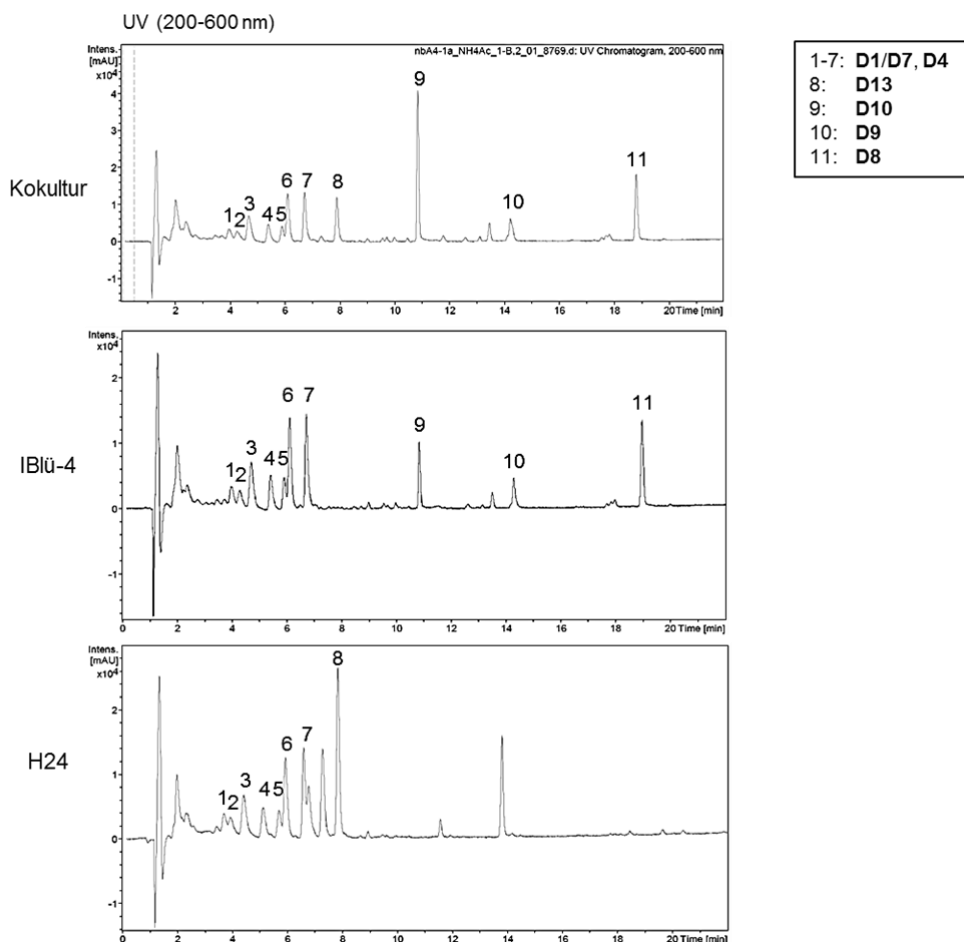


Abbildung 20: Vergleich der UV-Chromatogramme der Kulturen (UV 200-600 nm).

Die isolierten Diketopiperazine **D1/D7**, **D2** und **D4** (Peak 1-7) befanden sich im Chromatogramm in einem Bereich von 4-7 min und wurden sowohl von dem *Bacillus*-Stamm IBLü-4 als auch von dem Hefe-Stamm H24 in ähnlichen Mengen gebildet. Verbindung **D13** (Peak 8), mit einem Molekül-Ion von $[M+H]^+$ $m/z = 162$, wurde von der Hefe produziert und fand sich auch in der Kokultur wieder. Das Molekül-Ion der Verbindung **D9** (Peak 10, $[M+H]^+$ $m/z = 714$) war bei 14.2 min zu beobachten und wurde von IBLü-4 gebildet, wodurch das Signal auch in der Kokultur präsent war. Der Peak 9 bei 10.9 min spiegelte Verbindung **D10** mit einem Molekül-Ion von $[M+H]^+$ $m/z = 502$ wider. Dieses Peptid wurde von IBLü-4 gebildet und liegt in einer etwas höheren Konzentration in der Kokultur vor. Der Peak 11, mit einer Retentionszeit von 18.8 min, wurde der Verbindung **D8** (Baceridin) zugeordnet, welches von Stamm IBLü-4 gebildet wurde. Vergleicht man die Peakhöhenverhältnissen zu den anderen Peaks, wie zum Beispiel die der Diketopiperazine, war keine große Veränderung von der Reinkultur zur Kokultur erkennbar. Die isolierte Gesamtmenge an Verbindung **D8** in der ersten

4 L-Kulturaufarbeitung lag bei 6.7 mg, während aus der 1 L-Kokultur 2.2 mg von Verbindung **D8** isoliert werden konnten. Bei einer Hochrechnung von 1 L auf 4 L wären das 8.8 mg. Der Wert ist jedoch nur ein Schätzwert, da nicht von einem linearen Zusammenhang zwischen Menge an Kulturbrühe und Menge an produzierten Metaboliten ausgegangen werden kann. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kokultur keinen bedeutenden Produktionsanstieg von Verbindung **D8** erbracht hat.

3.2 Diketopiperazine

3.2.1 Strukturaufklärung

Über die typischen ^{13}C -NMR-Verschiebungen von Amid-Carbonyl-Gruppen (C-1, C-6, $\delta_{\text{C}} = 165 \text{ ppm}$ bis 171 ppm) und die charakteristischen ^1H -NMR-Signale der α -Protonen (2-H, 7-H) von Aminosäuren zwischen $\delta_{\text{H}} = 4.4$ und 3.0 ppm (bis $\delta_{\text{H}} = 2.2 \text{ ppm}$ bei einer *trans*-Konfiguration) konnte die Grundstruktur von Diketopiperazinen, in denen zwei Aminosäuren über Amidbindungen miteinander verknüpft sind, identifiziert werden. Durch die Auswertung des ^1H , ^1H -COSY-Spektrums ließ sich eine Kette von drei CH_2 -Einheiten (3-H bis 5-H, $\delta_{\text{H}} = 1.15\text{-}3.71 \text{ ppm}$) bestimmen, in der eine der CH_2 -Gruppen eine HMBC-Korrelation zu einer α -CH-Gruppe zeigte. Außerdem lag das Signal einer der endständigen CH_2 -Gruppen (H-5) im Vergleich zu den anderen CH_2 -Signalen weiter im Tieffeld. Es gibt nur zwei Aminosäuren, Arginin und Prolin, die eine solche CH_2 -Kette enthalten. Die Guanidin-Einheit von Arginin zeigt üblicherweise eines der Kohlenstoffsignale eine Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 158\text{-}159 \text{ ppm}$. Im ^{13}C -Spektrum der hier isolierten Diketopiperazine war kein Signal in dem Bereich zu beobachten oder eindeutig Arginin zuzuordnen. Infolgedessen konnte die CH_2 -Kette zu einer Prolin-Einheit zusammengefasst werden. Die jeweiligen Carbonylkohlenstoffatome wurden über die Korrelationen der α -Protonen zugeordnet. Auf die Bestimmung der zweiten Aminosäure-Einheit wird in der Strukturaufklärung der jeweiligen Diketopiperazine eingegangen. Die in dieser Arbeit isolierten Diketopiperazine sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Stereochemie der Diketopiperazine **D1**, **D2**, **D3** und **D4**, die aus Abschnitt 3.1.1 bis 3.1.4 isoliert oder durch HPLC-MS identifiziert wurden, wurde nicht weiter bestimmt. In dem folgenden Abschnitt der Strukturaufklärung der Diketopiperazine wird nur auf die Strukturen eingegangen, deren Stereochemie bestimmt wurde.

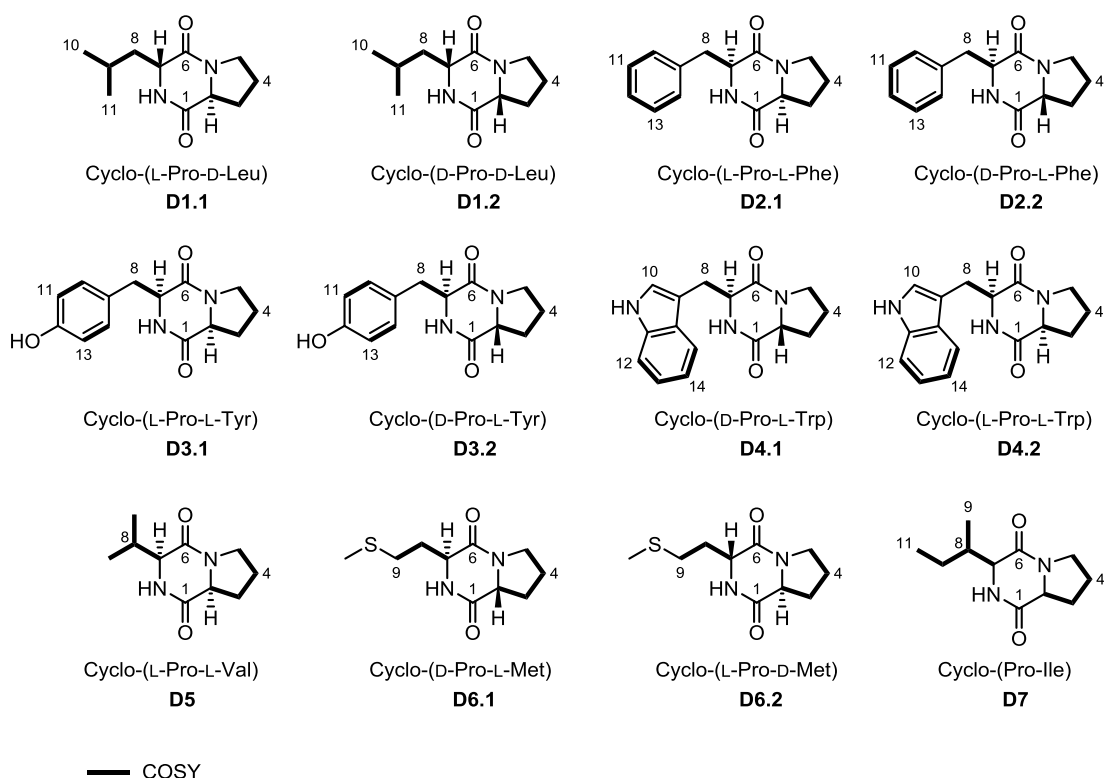


Abbildung 21: Isolierte Diketopiperazine.

Cyclo-(L-Pro-D-Leu) (**D1.1**)/ Cyclo-(D-Pro-D-Leu) (**D1.2**)

Über eine hochauflösende Q-ToF-UPLC-MS von Diketopiperazin **D1.1** konnte ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 211.1443$ ermittelt werden, für Diketopiperazin **D1.2** ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 211.1447$. Für beide Diketopiperazine konnte eine Summenformel von $C_{11}H_{18}N_2O_2$ erhalten werden. Es lagen keine olefinischen oder aromatischen C-Atome vor. Ausgehend von den beiden CH-Gruppen des Diketopiperazin-Rings konnten über die $^1H, ^1H$ -Kopplungen im $^1H, ^1H$ -COSY-Spektrum von beiden Diketopiperazinen ein Leucinrest identifiziert werden. Die beiden endständigen Methylgruppen der Leucin-Gruppe (10-H, 11-H) waren durch die Protonensignale bei $\delta_H = 0.95$ und $\delta_H = 1.00$ ppm mit je einem Integral von 3H zu erkennen. Diese bildeten je ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von $^3J_{9,10/11} = 6.6$ Hz. Die absoluten Konfigurationen von Cyclo-(L-Pro-D-Leu) (**D1.1**) und Cyclo-(D-Pro-D-Leu) (**D1.2**) konnten durch den Vergleich der gemessenen Drehwerte sowie der Protonen- und ^{13}C -Spektren mit den Literaturdaten^[126,127] bestimmt werden. Cyclo-(L-Pro-D-Leu) und Cyclo-(D-Pro-D-Leu) wurden in der Literatur aus marinen Bakterien isoliert und zeigten einen antibiotischen Effekt gegenüber dem Bakterium

Vibrio anguillarum.^[72] Cyclo-(L-Pro-D-Leu) konnte außerdem auch aus dem marinen Pilz *Chromocleista* sp. isoliert werden.^[128]

Cyclo-(L-Pro-L-Phe) (D2.1)/ Cyclo-(D-Pro-L-Phe) nbA1-12.2.9 (D2.2)

Die Bestimmung der Masse durch eine hochauflösende Q-ToF-UPLC-MS von Diketopiperazin **D2.1** lieferte ein Molekül-Ion $[M+Na]^+$ von $m/z = 267.1108$. Das Molekül-Ion von Diketopiperazin **D2.2**, $[M+H]^+$ $m/z = 245.0674$, wurde durch eine hochauflösende ESI-MS-Messung erhalten. Somit konnte für beide Diketopiperazine eine Summenformel von $C_{14}H_{16}N_2O_2$ bestimmt werden. Die im Protonenspektrum liegenden Multipletts im Bereich von $\delta_H = 7.23$ bis 7.32 ppm (5H), ließen bei beiden Strukturen auf einen monosubstituierten Benzolring schließen. Durch die hochfeldverschobenen Signale der CH_2 -Gruppe von Diketopiperazin **D2.1** (8- H_a , $\delta_H = 2.78$ ppm; 8- H_b , $\delta_H = 3.61$ ppm) und die Kopplung der Protonen mit dem Proton der benachbarten CH-Gruppe (7-H) wurde die Vermutung, dass es sich bei der zweiten Aminosäure des Diketopiperazins um Phenylalanin handelt, bestätigt. Auf Grund des CH-Signals der Prolin-Komponente (2-H) von Diketopiperazin **D2.1**, welches bei $\delta_H = 4.08$ ppm lag, konnte eine *cis*-Konfiguration angenommen werden. Die Signale der Protonen 5- H_a und 5- H_b vom Diketopiperazin **D2.2** waren im Vergleich zum Spektrum von **D2.1** etwas ins Tieffeld verschoben ($\delta_H = 3.64$ ppm, $\delta_H = 3.41$ ppm). Außerdem lagen die Protonen der CH_2 -Gruppe des Phenylalanin-Restes (8-H) bei $\delta_H = 3.10$ ppm und bildeten ein einziges Signal statt zwei Signale, die in einem Abstand von $\delta_H = 0.8$ ppm auseinander lagen. Am Auffallendsten war jedoch, dass das 2-H-Signal der Prolin-Komponente ins Hochfeld verschoben lag. Es konnte daher eine *trans*-Konfiguration angenommen werden. Auf Grund der räumlichen Anordnung kommt es zu einer Abschirmung durch den aromatischen Ring. Die absoluten Konfigurationen von Cyclo-(L-Pro-D-Phe) (**D2.1**) und Cyclo-(D-Pro-L-Phe) (**D2.2**) konnten durch den Vergleich der gemessenen Drehwerte mit den Literaturwerten^[126] bestimmt werden. Außerdem wurden die Strukturen durch die Übereinstimmung der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Literaturdaten^[126,129] bestätigt. Das aus *Lactobacillus plantarum* isolierte Cyclo-(L-Pro-L-Phe) wirkt inhibierend auf das Wachstum der Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Penicillium roqueforti*.^[76] Das Diketopiperazin Cyclo-(D-Pro-L-Phe) konnte aus marinen Bakterien, die mit Kulturen von der großen Pilgermuschel *Pecten maximus* assoziiert waren, isoliert werden und zeigt Bioaktivität gegen *Vibrio anguillarum*.^[72]

Cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (D3.1)/ Cyclo-(D-Pro-L-Tyr) (D3.2)

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe einer hochauflösenden Q-ToF-UPLC-MS von Diketopiperazin **D3.1** lieferte ein Molekül-Ion $[M+Na]^+$ von $m/z = 283.1059$, von Diketopiperazin **D3.2** ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 261.1237$. Somit konnte für beide Strukturen eine Summenformel von $C_{14}H_{17}N_2O_3$ erhalten werden. Durch die aromatischen Signale im Protonenspektrum ($\delta_H = 6.97$ ppm, d, 1H; $\delta_H = 6.71$ ppm, d, 1H) und die Signale bei $\delta_H = 3.11$ ppm (dd, 1H) und $\delta_H = 2.87$ ppm (dd, 1H), die einer CH_2 -Gruppe entsprechen, konnte bestätigt werden, dass es sich bei der zweiten Aminosäure-Komponente jeweils um Tyrosin handelte. Auf Grund des CH-Signals der Prolin-Komponente (2-H) von Diketopiperazin **D3.1**, welches bei $\delta_H = 4.08$ ppm liegt, konnte eine *cis*-Konfiguration angenommen werden. Das 2-H-Signal von Diketopiperazin **D3.2**, welches bei $\delta_H = 2.61$ ppm lag, ließ auf eine *trans*-Konfiguration schließen. Die absoluten Konfigurationen von Cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (**D3.1**) und von Cyclo-(D-Pro-L-Tyr) (**D3.2**) wurden durch den Vergleich der gemessenen Drehwerte mit den Literaturwerten^[126] bestimmt. Außerdem wurden die Strukturen durch die Übereinstimmung der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Literaturdaten^[59,126,130] bestätigt. Cyclo-(L-Pro-L-Tyr), welches unter dem Namen Maculosin bekannt ist und zum Beispiel aus dem Schimmelpilz *Alternaria alternata* isoliert wurde, wirkt phytotoxisch gegen die Rispen-Flockenblume.^[74] Das Diketopiperazin Cyclo-(D-Pro-L-Tyr) konnte aus einem *Bacillus* sp.-Stamm isoliert werden. Es zeigte Bioaktivitäten gegen gram-positive Bakterien und gegen den Pilz *Penicillium expansum*, der häufig Pilzerkrankungen an Früchten, wie Äpfeln und Weinreben auslöst.^[131]

Cyclo-(D-Pro-L-Trp) (D4.1)/ Cyclo-(L-Pro-L-Trp) (D4.2)

Über eine hochauflösende Q-ToF-UPLC-MS von Diketopiperazin **D4.1** wurde ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ $m/z =$ von 284.1399 ermittelt. Über eine hochauflösende ESI-MS-Messung von Diketopiperazin **D4.2** konnte ein Molekül-Ion $[M+Na]^+$ von $m/z = 306.1220$ bestimmt werden. Für beide Diketopiperazine lag eine Summenformel von $C_{16}H_{18}N_3O_2$ vor. Im aromatischen Bereich des Protonenspektrums von Diketopiperazin **D4.1** waren insgesamt vier Signale zu erkennen, die zusammen mit dem NH-Protonensignal bei einer Verschiebung von $\delta_H = 7.89$ ppm und der benachbarten CH-Gruppe ($\delta_H = 7.04$ ppm, 10-H) einen Tryptophan-Rest bildeten. Bei Diketopiperazin **D4.2** lag nach Vergleich der Spektren ebenfalls ein Tryptophan-Rest vor. Die

Hochfeldverschiebung des 2-H-Signals der Prolin-Komponente von Diketopiperazin **D4.1** ließ auf eine *trans*-Konfiguration schließen, da es durch die räumliche Anordnung zu einer Abschirmung durch den aromatischen Ring kommt. Das Protonensignal von 2-H von Diketopiperazin **D4.2** lag jedoch im Vergleich bei $\delta_H = 4.08$ ppm statt bei $\delta_H = 2.22$ ppm. Es konnte also eine *cis*-Konfiguration angenommen werden. Die absoluten Konfigurationen von Cyclo-(D-Pro-L-Trp) (**D4.1**) und Cyclo-(L-Pro-L-Trp) (**D4.2**) konnten durch den Vergleich der gemessenen Drehwerte mit den Literaturdaten^[39,126] bestimmt werden. Außerdem wurden Vergleichs-NMR-Spektren^[126] herangezogen, welche die Strukturen bestätigten. Cyclo-(D-Pro-L-Trp) konnte aus einem Pilz-Endophyten der Pflanze *Huperzia serrata* isoliert werden und wirkt gegen *Penicillium* sp..^[132] Das aus *Streptomyces* sp.^[133] und einem mit dem Nematoden *Rhabditis* sp. assoziierten *Bacillus cereus* isolierte Diketopiperazin Cyclo-(L-Pro-L-Trp) wirkt gegen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* und *Pseudomonas aeruginosa*.^[134]

Cyclo-(L-Pro-L-Val) (D5)

Über eine hochauflösende ESI-MS-Messung von Diketopiperazin **D5** konnte ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 197.1290$ und somit eine Summenformel von $C_{10}H_{16}N_2O_2$ erhalten werden. Im hochfeldverschobenen Bereich befanden sich zwei Dubletts mit einem Integral von 3H (9-H, 10-H), die auf eine Valin-Gruppe hindeuteten. Die Vermutung wurde durch die Kopplungen mit dem 8-H, welches wiederum mit dem Proton 7-H koppelte, bestätigt. Die absolute Konfiguration von Cyclo-(L-Pro-L-Val) (**D5**) konnte durch den Vergleich des gemessenen Drehwertes sowie des Protonen-Spektrums mit den Literaturdaten^[126] bestimmt werden. Cyclo-(L-Pro-L-Val) konnte aus dem marinen Schwamm *Tedania ignis*^[135] und *Chromocleista* sp.^[128] sowie aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus*^[68] und dem Pilz-assoziierten Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* isoliert werden.^[65]

Cyclo-(D-Pro-L-Met) (D6.1)/ Cyclo-(L-Pro-D-Met) (D6.2)

Mit Hilfe einer hochauflösenden ESI-MS-Messung wurde von Diketopiperazin **D6.1** ein Molekül-Ion $[M+Na]^+$ von $m/z = 251.0830$ und von Diketopiperazin **D6.2** ein Molekül-Ion $[M+Na]^+$ von $m/z = 251.0830$ erhalten werden. Als Summenformel beider Strukturen konnte $C_{10}H_{16}N_2O_2S$ bestimmt werden. Das breite Singulett bei $\delta_H = 6.04$ ppm im

Protonenspektrum von Diketopiperazin **D6.1** konnte dem Signal der NH-Gruppe zugeordnet werden. Über die Kopplungen, ausgehend von dem Proton 7-H, konnten zwei aufeinanderfolgende CH₂-Gruppen identifiziert werden. Das im Hochfeld gelegene Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 2.12$ ppm mit einem Integral von 3H war charakteristisch für die Methylgruppe des Methionins und bestätigte diese Aminosäurekomponente als zweites im Diketopiperazin enthaltene Fragment. Die Verschiebungen der Protonensignale und deren Kopplungen untereinander waren weitgehend identisch mit denen des Diketopiperazins **D6.2**. Die absolute Konfiguration von Cyclo-(D-Pro-L-Met) (**D6.1**) und Cyclo-(L-Pro-D-Met) (**D6.2**) konnte durch den Vergleich des gemessenen Drehwertes sowie des Protonen-Spektrums mit den Literaturdaten^[46,126] bestimmt werden. Das Diketopiperazin Cyclo-(D-Pro-L-Met) konnte aus einem *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* isoliert werden und zeigte Bioaktivitäten gegen Pilze, wie *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* und *Penicillium expansum*, die in der Landwirtschaft eine große Rolle spielen.^[134] Das Enantiomer Cyclo-(L-Pro-D-Met), das aus einem *Rhabditis* sp. assoziierten *Bacillus cereus* isoliert wurde, wirkt gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*.^[136]

Cyclo-(Pro-Ile) (**D7**)

Über eine hochauflösende ESI-MS-Messung von Diketopiperazin **D7** wurde ein Molekül-Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ von $m/z = 211.1449$ ermittelt, wodurch eine Summenformel von C₁₀H₁₉N₂O₂ erhalten werden konnte. Ausgehend von den beiden CH-Gruppen des Diketopiperazin-Ringes (2-H, 7-H) konnte über die ¹H,¹H-Kopplungen ein Isoleucinrest identifiziert werden. Die Struktur des Cyclo-(Pro-Ile) (**D7**) konnte durch den Vergleich des Protonenspektrums mit Literaturdaten^[126] bestimmt werden. Das Diketopiperazin Cyclo-(Pro-Ile) besitzt drei Stereozentren. Daraus folgen acht mögliche Stereoisomere, deren Drehwerte in der Literatur nicht alle beschrieben sind. Der gemessene Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +37.5$ (c = 0.16; EtOH) stimmte mit keinem der vorhandenen Literaturwerte^[33,126,127,129,137] überein. Der Vergleich der Werte wurde zugleich durch die angegebenen Drehwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen in Ethanol erschwert. Es könnte sich auch bei der isolierten Substanz um eine Mischung von mehreren Isomeren gehandelt haben, wodurch der Drehwert nicht mehr eindeutig zugeordnet werden konnte. Da aber das Proton 2-H bei einer Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 4.08$ ppm liegt, kann eine

cis-Konfiguration zwischen 2-H und 7-H angenommen werden. Cyclo-(Pro-Ile) konnte aus geröstetem Kaffee isoliert werden.^[138]

3.2.2 Biosynthese

2,5-Diketopiperazine (DKP) entstehen durch die Kondensation von zwei Aminosäuren^[139] (Abbildung 22) und sind aus Bakterien als auch aus Pilzen bekannt.

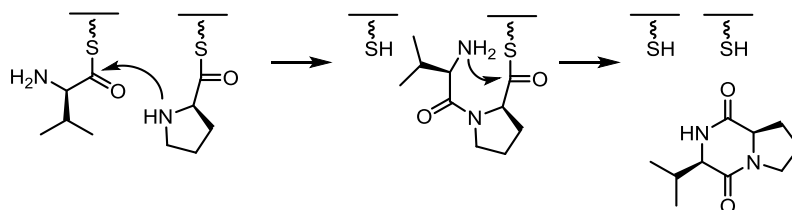


Abbildung 22: 2,5-Diketopiperazinbiosynthese.

Sie werden über die entsprechenden Aminosäuren über mehrere Wege biosynthetisch hergestellt. DKPs können durch Synthese mittels nichtribosomaler Peptidsynthese durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase, als Nebenprodukt bei der nichtribosomalen Peptidsynthese und durch mehrere Enzyme, die durch ein Gencluster für die DKP-Synthese codiert werden, gebildet werden.^[140] Sie besitzen häufig die Aminosäure Prolin als Baustein und werden oft beim Screening von mikrobiellen Extrakten gefunden. DKPs sind biosynthetisch und synthetisch^[70] leicht zugänglich. In der Natur vorkommende DKPs setzen sich überwiegend aus zwei L-Aminosäuren zusammen, es sind aber auch DL-, LD- und DD-Kombinationen bekannt, die aus nicht-enzymatischen Epimerisierungen aus dem LL-Isomer entstehen können.^[71] Da bisherige Bestimmungen der Stereozentren in der Literatur oft fehlerhaft sind,^[71] kann keine genaue Aussage über die Häufigkeit von D-Aminosäuren in DKPs gemacht werden. DKPs konnten auch in Säugetieren identifiziert werden, wie zum Beispiel in Extrakten von Kaninchenhautgewebe.^[141] Sie sind auch in vielen Lebensmitteln zu finden und verursachen oftmals einen bitteren Geschmack.^[142]

3.3 Oligopeptide

3.3.1 Strukturaufklärung von Baceridin (D8)

Über eine hochauflösende ESI-MS-Messung von Verbindung **D8** wurde ein Molekül-Ion $[M+Na]^+$ von $m/z = 718.4272$ ermittelt. Somit konnte eine Summenformel von $C_{37}H_{57}N_7O_6$ erhalten werden. Über 1D- und 2D-NMR-Spektren konnte die Struktur als Baceridin (**D8**, Abbildung 23) identifiziert werden.

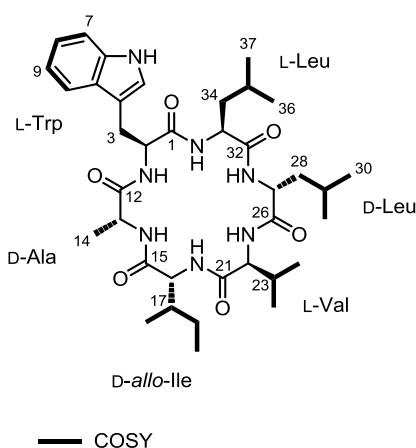


Abbildung 23: Struktur des Baceridins (D8).

Um das Spektrum mit dem des zuvor schon aufgeklärten Baceridins^[143] vergleichen zu können und die Struktur zu bestätigen, wurden das 1H -NMR und das $^1H, ^1H$ -COSY-NMR zusätzlich in DMSO- d_6 gemessen. Die Auflistung der NMR-Daten ist den Spektren, die in deuteriertem Methanol gemessen wurden, entnommen (Tabelle 1).

Im 1H -NMR-Spektrum konnten die charakteristischen α -Amidprotonen-Signale ($\delta_H = 4.04$ - 4.59 ppm) und im ^{13}C -NMR-Spektrum die sechs Carbonyl- ($\delta_C = 173.4$ - 176.2 ppm) sowie die sechs α -Amidkohlenstoffatome ($\delta_C = 50.3$ - 61.8 ppm) identifiziert und somit die peptidische Struktur nachgewiesen werden. Außerdem konnten durch weitere 2D-Spektren die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Valin und Isoleucin identifiziert werden. Auf die genaue Zuordnung der quartären Carbonylkohlenstoffatome über ein $^1H, ^{13}C$ -HMBC-NMR-Spektrum wurde verzichtet, da das 1H -NMR-Spektrum (gemessen in DMSO- d_6) identisch zu dem der literaturbekannten Struktur war und somit die Struktur bestätigt werden konnte.^[143]

Tabelle 1: NMR-Daten des Baceridins (D8) (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, in CD_3OD).

Einheit	Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	COSY
L-Trp	1	174.3 ^[b]	-			
	2	57.8	4.42	dd	8.9, 4.3	3a, 3b
	2-NH	-	7.96	m		
	3	28.2	(a) 3.36 (b) 3.17	m dd	15.4, 9.0	2, 3b, 5 2, 3a, 5
	4	110.5	-			
	5	124.7	7.24	s		3a, 3b
	6	138.3	-			
	7	112.5	7.34	d	7.9	8
	8	122.8	7.10	m		7, 9, 10
	9	120.2	7.02	m		8, 10
	10	119.3	7.59	d	7.9	8, 9
D-Ala	11	128.7	-			
	12	176.2 ^[b]	-			
	13	50.3	4.59	m		14
D-allo-Ile	13-NH	-	7.37	d	6.2	
	14	19.1	1.22	d	6.8	13
	15	173.9 ^[b]	-			
D-allo-Ile	16	58.6	4.31	d	3.8	17
	16-NH	-	8.07	dd	8.4, 1.5	
	17	37.5	2.18	m		16, 18, 19
	18	14.7	0.94	m		17
	19	27.6	1.37	m		17, 20
	20	12.3	0.94	m		19
L-Val	21	175.8 ^[b]	-			
	22	61.8	4.04	d	9.4	23
	22-NH	-	7.84	t	6.6	
	23	30.8	1.95	m		22, 24, 25
	24	19.9	1.02	d	6.8	23
	25	19.7	0.94	m		23
L-Leu	26	174.5 ^[b]	-			
	27	52.4	4.53	m		28
	27-NH	-	7.24	d	8.1	
	28	40.5	1.57	m		27, 29
	29	26.0	1.57	m		28, 30, 31
	30	23.8	0.83	d	6.8	29
L-Leu	31	23.3	0.94	m		29
	32	173.4 ^[b]	-			
	33	53.0	4.37	dd	10.9, 4.1	34a, 34b
	33-NH	-	7.62	dd	7.70	
	34	41.7	(a) 1.68 (b) 1.57	m m		34b, 35 34a, 35
	35	25.8	1.57	m		34a, 34b, 36, 37
	36	22.9	0.93	m		35
	37	21.4	0.72	d	6.4	35

[a] Die NH-Signale stammen aus der ^1H -NMR-Messung in DMSO-d_6 (600 MHz, 273 K), [b] Vorschlag zur Zuordnung.

3.3.2 Strukturaufklärung des azyklischen Baceridins (D9)

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Verbindung **D9** durch eine ESI-MS-Messung lieferte ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 714.4547$. Somit konnte eine Summenformel von $C_{37}H_{60}N_7O_7$ erhalten werden. Die 1D-Spektren zeigten Ähnlichkeit zu dem zyklischen Baceridin (**D8**).

Tabelle 2: NMR-Daten des azyklischen Baceridins (D9) (1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz, in CD_3OD).

Einheit	Atom	δ_C [ppm]	δ_H [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	COSY	HMBC
D-allo-Ile	1	178.3	-				
	2	59.2 ^[a]	4.36	d	3.9	3	1, 3, 4
	3	39.5	1.99	m		2, 4, 5	5
	4	15.6	0.88	m		3	
	5	28.2	(a) 1.40 (b) 1.19	m m		3, 5b, 6 3, 5a, 6	3, 4 3, 4
L-Val	6	12.6	0.96	m		5a, 5b	5
	7	173.2	-				
	8	61.7	4.10	d	8.4	9	7, 9
	9	31.3	2.15	m		8, 10, 11	8
	10	19.1	0.96	m		9	9
D-Leu	11	20.2	0.98	m		9	9
	12	174.6	-				
	13	52.7	4.54	m		14	12, 14
	14	41.4	1.65	m		13, 15	13, 15
	15	26.0	1.45	m		14, 16, 17	
L-Leu	16	23.6	0.92	m		15	15
	17	21.9	0.84	d	6.7	15	15
	18	174.5	-				
	19	53.5	4.33	dd	10.1, 4.9	20a, 20b	18, 20
	20	41.0	(a) 1.65 (b) 1.51	m m		19, 20b, 21 19, 20a, 21	19, 21 19, 21
L-Trp	21	26.2	1.65	m		20a, 20b, 22, 23	20
	22	23.5	0.96	m		21	21
	23	22.2	0.92	m		21	21
	24	174.4	-				
	25	56.9	4.62	dd	9.6, 4.6	26a, 26b	24
D-Ala	26	28.8	(a) 3.33 (b) 3.15	m dd	15.0, 9.6	25, 26b 25, 26a	24, 25, 27 24, 25, 27
	27	110.7	-				
	28	124.8	7.21	s			27
	29	128.7	-				
	30	112.5	7.34	d	8.2	31	32
D-Ala	31	122.7	7.10	m		30, 32	33
	32	120.1	7.03	m		31, 33	30
	33	119.4	7.62	d	8.0	32	31
	34	138.3	-				
	35	172.9	-				
D-Ala	36	50.5	4.03	q	7.2	37	35
	37	17.6	1.28	m		36	35, 36

[a] Daten aus 1H , ^{13}C -HSQC-NMR.

Es konnten sechs α -Amidprotonen-Signale im ^1H -NMR ($\delta_{\text{H}} = 4.03\text{--}4.62$ ppm) sowie sechs Carbonyl- ($\delta_{\text{C}} = 172.9\text{--}178.9$ ppm) und sechs α -Amidkohlenstoffatome ($\delta_{\text{C}} = 50.5\text{--}61.7$ ppm) im ^{13}C -NMR-Spektrum beobachtet werden (Tabelle 2).

Anhand des Molekulargewichts konnte auf ein azyklisches Hexapeptid geschlossen werden. Bei den α -Amidprotonensignalen gab es Unterschiede in der Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum. Auffällig war die Hochfeldverschiebung des α -Protonensignals des Alanin-Aminosäurerestes (36-H) von $\delta_{\text{H}} = 4.59$ ppm zu $\delta_{\text{H}} = 4.03$ ppm. Dies ließ auf den Alaninrest als terminale Aminosäure mit einer freien Aminogruppe schließen.

Über $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektren konnten die Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Valin und Isoleucin identifiziert werden. Der Vergleich des Protonenspektrums mit dem entsprechenden Literaturspektrum des azyklischen Baceridins^[143] konnte die Struktur bestätigen (Abbildung 24).^[144] Es handelte sich um das azyklische Baceridin (**D9**) mit der Sequenz D-Ala-L-Trp-L-Leu-D-Leu-L-Val-D-*allo*-Ile.

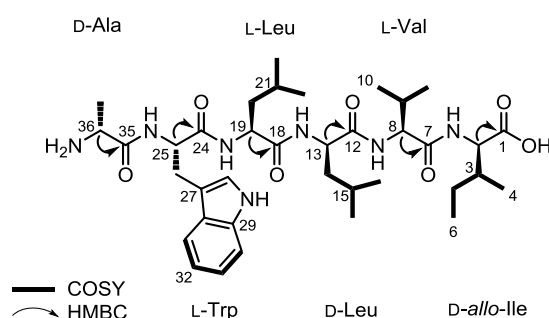


Abbildung 24: Struktur des azyklischen Baceridins (**D9**).

3.3.3 Strukturaufklärung des Tetrapeptids **D10**

Eine hochauflösende ESI-MS-Messung der Verbindung **D10** lieferte ein Molekül-Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ von $m/z = 502.3035$, wodurch eine Summenformel von $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$ erhalten werden konnte. Vier charakteristische α -Amidprotonen (2-H, 8-H, 14-H, 25-H) bei $\delta_{\text{H}} = 3.70$ bis 4.52 ppm im ^1H -NMR-Spektrum deuteten auf ein Tetrapeptid hin (Tabelle 3). Vier entsprechende Amidkohlenstoffatome (C-1, C-7, C-13, C-24) bei $\delta_{\text{C}} = 170.4$ bis 174.1 ppm konnten dies bestätigen.

Tabelle 3: NMR-Daten des Tetrapeptids (D10) (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz, in DMSO-d_6).

Einheit	Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	COSY	HMBC
D-Leu	1	174.1	-				
	2	51.8	4.01	m		2-NH, 3	1
	2-NH		7.59	d	7.8	2	
	3	41.3	1.47	m		2, 4	2, 4
	4	24.3	1.47	m		3, 5, 6	3
	5	21.5	0.86	d	6.3	4	4
L-Leu	6	23.1	0.83	m		4	4
	7	170.1 ^[a]	-				
	8	51.1	4.26	m		8-NH, 9	9
	8-NH		8.21	d	7.8	8	
	9	40.1	(a) 1.58 (b) 1.47	m m		8, 10 8, 10	8, 10 8, 10
	10	24.4	1.58	m		11, 12	9
L-Trp	11	21.9	0.83	m		10	10
	12	21.9	0.83	m		10	10
	13	171.7 ^[a]	-				
	14	54.2	4.52	m		14-NH, 15	15
	14-NH		8.60	br. s.		14	
	15	27.7	(a) 3.14 (b) 2.93	m dd	14.5, 9.8	14 14	14, 16 14, 16
	16	109.8	-				
	17	123.8	7.15	d	1.4	17-NH	16
	17-NH		10.82	br. s.		17	
	18	127.1	-				
D-Ala	19	118.3	7.59	d	7.8	20	21, 23
	20	118.2	6.97	t	7.2	19, 21	18, 22
	21	120.9	7.05	t	7.5	20, 22	19, 23
	22	111.3	7.32	d	7.9	21	18, 20
	23	136.0	-				
	24	170.4	-				
	25	48.4	3.70	m		26	26
	26	17.6	1.05	d	6.7	25	24

[a] Vorschlag zur Zuordnung.

Über die ^1H , ^1H -COSY- und ^1H , ^{13}C -Kopplungen konnten als Aminosäuren Tryptophan, Alanin und zweimal Leucin identifiziert werden. Bei den Aminosäuren Tryptophan und den beiden Leucinen konnten die ^1H , ^1H -COSY-Kopplung des α -Amidprotons und der benachbarten NH-Gruppe beobachtet werden. Das Integral der jeweiligen NH-Gruppe im ^1H -NMR lag bei 1H. Somit musste es sich bei Alanin um einen endständigen Rest mit einer NH_2 -Gruppe handeln. Die fehlende Kopplung des α -Amidprotons von Alanin zu einer NH_2 -Gruppe wurde auf Austauscheffekte mit dem deuterierten Lösungsmittel zurückgeführt. Des Weiteren musste eines der vier Carboxylkohlenstoffatome der Carbonsäuregruppe des zweiten endständigen Aminosäurerestes angehören. Da die Verschiebung eines Amidkohlenstoffatoms ($\delta_{\text{C}} = 174.1$ ppm) von den anderen Signalen ($\delta_{\text{C}} = 170.4, 170.7, 171.7$ ppm) etwas abwich, wurde das Signal bei $\delta_{\text{C}} = 174.1$ ppm als

Carbonsäurerest (C-1) angenommen. Über die $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Kopplung des α -Amidprotons zu $\delta_{\text{C}} = 174.1$ ppm konnte eine Leucingruppe als endständig bestimmt werden. Es musste sich also um eine Sequenz von Ala-Trp-Leu-Leu oder Ala-Leu-Trp-Leu handeln. Auch das Fragment $m/z = 371$ aus dem Massenspektrum, welches mit einer Ala/Trp/Leu-Zusammensetzung übereinstimmt, konnte die Vermutung bestätigen. Ein weiteres Massefragment, das die Zusammensetzung der Aminosäuren erklären könnte, wurde nicht beobachtet. Das $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum konnte ebenfalls keinen Aufschluss geben, da nicht alle Kopplungen sichtbar waren. Als Sequenz des Tetrapeptids **D10** wurde Ala-Trp-Leu-Leu vorgeschlagen (Abbildung 25), da diese Strukturelemente auch im zyklischen Hexapeptid Baceridin (**D8**) und im isolierten azyklischen Hexapeptid (**D9**) vorkommen.

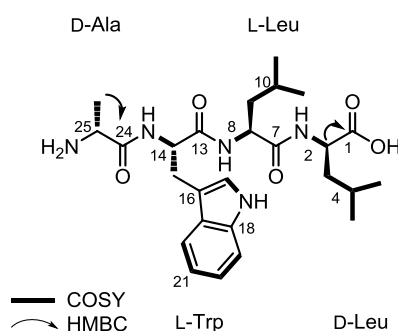


Abbildung 25: Vorschlag zur Struktur des azyklischen Tetrapeptids (**D10**).

3.3.4 Strukturaufklärung des Hexapeptids **D11**

Über ein Molekül-Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ von $m/z = 682.4292$ durch eine ESI-MS-Messung von Hexapeptid **D11** konnte eine Summenformel von $\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_6$ erhalten werden. Die sechs α -Amidprotonen-Signale ($\delta_{\text{H}} = 4.01\text{--}4.38$ ppm) und die sechs Amid-NH-Signale (7.33–8.41 ppm) im ^1H -NMR, die mit den α -Amidprotonen-Signalen koppelten, waren charakteristisch für sechs Aminosäuren als Strukturelemente (Tabelle 4).

Tabelle 4: NMR-Daten des Hexapeptids (D11) (^1H : 700 MHz, ^{13}C ^[a], in DMSO- d_6).

Einheit	Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	COSY
Trp	1	n. b.				
	2	55.4	4.15	m		2-NH, 3
	2-NH	-	8.38	d	6.2	2
	3	26.7	(a) 3.19 (b) 2.90	dd dd	14.7, 3.3 14.5, 10.4	2, 3b 2, 3a
	4	n. b.				
	5	123.0	7.25	d	2.2	5-NH
	5-NH	-	10.84	s		5
	6	n. b.				
	7	119.7	7.31	d	7.5	8
	8	120.4	7.06	t	7.5	7, 9
Ala	9	117.9	6.99	t	7.3	8, 10
	10	128.4	7.52	d	8.0	9
	11	n. b.				
	12	n. b.				
	13	48.6	4.35	m		13-NH, 14
	13-NH	-	7.42	d	5.6	13
	14	18.7	1.02	d	6.7	13
	15	n. b.				
	16	59.0	4.01	m		16-NH, 17
	16-NH	-	8.34	d	7.3	16
Val ^[b]	17	28.2	1.85	m		16, 18, 19
	18	22.2	0.89	m		17
	19	16.7	0.85	m		17
	20	n. b.				
	21	58.2	4.05	m		21-NH, 22
Val ^[b]	21-NH	-	8.41	d	9.0	21
	22	29.1	2.18	m		21, 23, 24
	23	18.9	0.85	m		22
	24	22.6	0.85	m		22
	25	n. b.				
Leu ^[b]	26	50.7	4.38	m		26-NH, 27
	26-NH	-	7.33	d	8.2	26
	27	41.6	1.42	m		26, 28
	28	25.0	1.46	m		27, 29, 30
	29	13.4	0.85	m		28
Leu ^[b]	30	20.9	0.79	d	6.5	28
	31	n. b.				
	32	50.3	4.31	m		32-NH, 33
	32-NH	-	7.99	d	8.8	32
	33	39.0	(a) 1.65 (b) 1.49	m m		32, 34 32, 34
	34	24.8	1.47	m		33, 35, 36
	35	22.1	0.89	m		34
	36	18.9	0.85	m		34

n.b.: nicht bestimmt, [a] Daten aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR, [b] Reihenfolge der jeweils identischen Aminosäure-Reste nicht geklärt.

Über die $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Kopplungen konnten die Aminosäuren Tryptophan, Alanin und jeweils zweimal Valin und Leucin identifiziert werden. Die Summenformel konnte dies bestätigen und auch eine zyklische Struktur nachweisen. Im Vergleich zu Baceridin (**D8**) war die Aminosäure D-*allo*-Ile durch einen Valin-Rest ausgetauscht. Da aus dem

^1H , ^{13}C -HMBC-NMR leider keine Kopplungen der α -Amidprotonen-Signale oder der NH-Signale zu den quartären Kohlenstoffen beobachtet werden konnten, war die Festlegung der Aminosäuresequenz des zyklischen Hexapeptids nicht möglich. Als Struktur wurde eine Baceridin-ähnliche Sequenz vorgeschlagen, in der statt der Isoleucin-Gruppe eine Valin-Gruppe vorhanden ist (Abbildung 26).

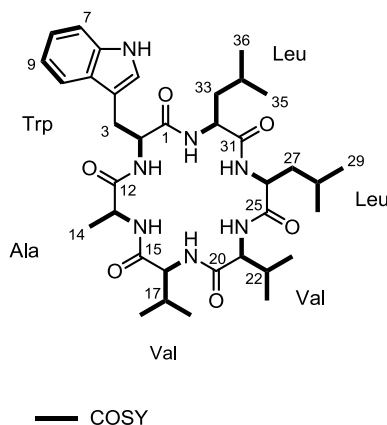


Abbildung 26: Vorschlag zur Struktur des zyklischen Hexapeptids (D11).

3.3.5 Bioaktivität von Baceridin (D8)

Das zyklische Hexapeptid Baceridin (D8) konnte erstmals 2011 von Jutta *et al.* am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung aus einer 3 L-Kultur des *Bacillus*-Stamm IBlü-4 isoliert werden.^[143] Die Struktur wurde mittels MS-Analyse und NMR-spektroskopischen Untersuchungen aufgeklärt. Die Konfiguration der Aminosäuren konnte durch chirale GC-MS und dem Vergleich mit Standard-Aminosäuren bestimmt werden. Die L-Konfiguration der Tryptophan-Aminosäureeinheit wurde über Marfey's Methode bestätigt.^[145] Mittels 2D-NMR-Methoden wurde die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt und die Struktur durch Totalsynthese bestätigt.^[143,146]

In biologischen Tests zeigte Baceridin moderate zytotoxische Aktivität gegen L-929-Mausfibroblasten ($\text{IC}_{50} = 2.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) und eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*. In Aktivitätsstudien auf die Wirkung gegenüber dem Proteasom, die von Kalesse und Malek durchgeführt wurden, zeigte Baceridin eine bemerkenswerte Aktivität in Bezug auf die Inhibierung des Proteasoms.^[143]

Das Proteasom ist für den Abbau von Proteinen zuständig und ist essenziell für die Regulierung des Zellzyklus. Das 26S-Proteasom in Eukaryoten besteht aus einer zentralen 20S-Einheit, die das katalytische Zentrum bildet, und zwei 19S großen Regulatorpartikeln, die für die Substraterkennung sowie den Transport der Proteinkette in das Kernpartikel verantwortlich sind. Zusammen bilden sie einen Hohlzylinder. Die 20S-Partikel ist aus je zwei äußeren heptameren Ringen, bestehend aus jeweils sieben α -Untereinheiten, und zwei inneren heptameren Ringen, bestehend aus jeweils sieben β -Untereinheiten, aufgebaut.^[147] Die 19S-Partikel erkennt ubiquitinierte Zielproteine und überführt sie in das Innere der Kernpartikel. Dort werden die Zielproteine abgebaut, wobei Ubiquitin und die jeweiligen Aminosäuren entstehen, die wieder freigesetzt werden (Abbildung 27). Proteasome befinden sich im Zellkern und im Zytoplasma, wo sie mit Zentrosomen, dem Zytoskelett und dem äußeren endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind.^[148]

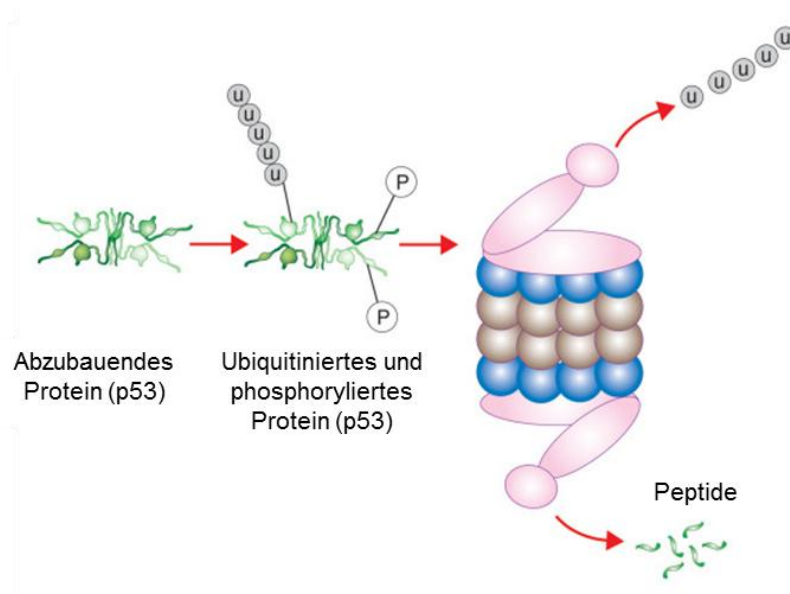


Abbildung 27: Proteasom-Ubiquitin-Weg.^[149]

Im Falle von bösartigen Tumorzellen besteht eine erhöhte Proteasomaktivität, wodurch es zur Zersetzung wichtiger Zellwachstums-regulierender Proteine kommt. So wird zum Beispiel auch das p53-Tumorsuppressorprotein degradiert. Dieses Protein spielt als „Wächter der Zelle“ eine bedeutende Rolle im Zellzyklus (Abbildung 28). Am Übergang von der G1- zur S-Phase kontrolliert p53 die Unversehrtheit des Genoms. Bei reparablen Schäden wird durch das p53-Protein die G1-Phase für die notwendige Reparatur

verlängert. Ist die Beseitigung des Schadens nicht möglich, wird die Apoptose eingeleitet. Ein Abbau von p53 führt in Tumorzellen zu einer schnelleren Zellproliferation.

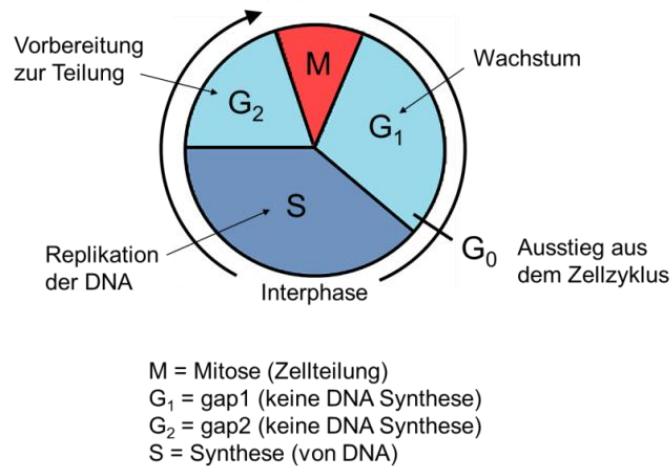


Abbildung 28: Zellzyklus.

In der Behandlung von HeLa-Zellen (Zervix-Karzinom) zeigte Baceridin IC₅₀-Werte von 1-2 µg mL⁻¹. Zur weiteren Untersuchung der Fähigkeit zur Inhibierung der Proteasomaktivität wurden verschiedene Tumorzellen mit der IC₅₀ entsprechenden Konzentration an Baceridin inkubiert. Mit Hilfe von fluorogenen Peptidsubstraten konnten die Trypsin-ähnlichen, Chromotrypsin-ähnlichen und Kaspase-ähnlichen proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms untersucht werden. Alle drei Aktivitäten wurden signifikant nach der Zugabe des Hexapeptids in allen verwendeten Krebszellen inhibiert (40-60%). Außerdem konnte auch in einem zellfreien System eine Inhibierung des Proteasoms durch Baceridin beobachtet werden. In weiterführenden Untersuchungen konnten eine Stabilisierung von p53 in Darmkrebszellen (HCT116 und RKO) sowie ein Einfluss auf die S-Phase im Zellzyklus festgestellt werden.^[143] Des Weiteren führte die Inkubation mit Baceridin zu einer vermehrten Abspaltung des Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP)-Proteins, einem Substrat der ausführenden Kaspasen, was auf die Herbeiführung des Zelltods schließen ließ. Trotz der bemerkenswerten Stabilisierung vom p53-Protein waren die Kinetiken der Apoptose-Induktion von p53-positiven und p53-negativen Zellen ähnlich. Dies ließ vermuten, dass die Zelltod-Signalwege, auf die Baceridin wirkt, nicht von der p53-Aktivierung abhängig sind.

3.3.6 Alanintest von Baceridin (D8)

Um Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in Bezug auf die Inhibierung des Proteasoms von Baceridin durchführen zu können, wurde die „Alanin-Scan“-Technik angewendet. Diese Methode beruht auf dem Austausch jeweils eines Aminosäurerestes durch Alanin und gibt damit Aufschluss über die Bedeutung spezifischer Reste in Bezug auf die Bioaktivität.^[150,151] Boger *et al.* konnten beispielsweise mit Hilfe dieser Methode einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss der Aminosäureseitenketten und antibakterieller Aktivität des 17-gliedrigen Naturstoffes Ramoplanins herstellen.^[150,151]

Zur Synthese der Baceridinanaloga wurden nur die Aminosäurereste, die keinen Alaninrest tragen, durch Alanin ersetzt (**Bac-2** bis **Bac-6**). Außerdem wurden in einem weiteren Hexapeptid die Aminosäurereste D-Leu und L-Leu mit dem jeweiligen Enantiomer ausgetauscht (**Bac-7**), sowie das authentische Baceridin (**Bac-1**) synthetisiert (Abbildung 29).

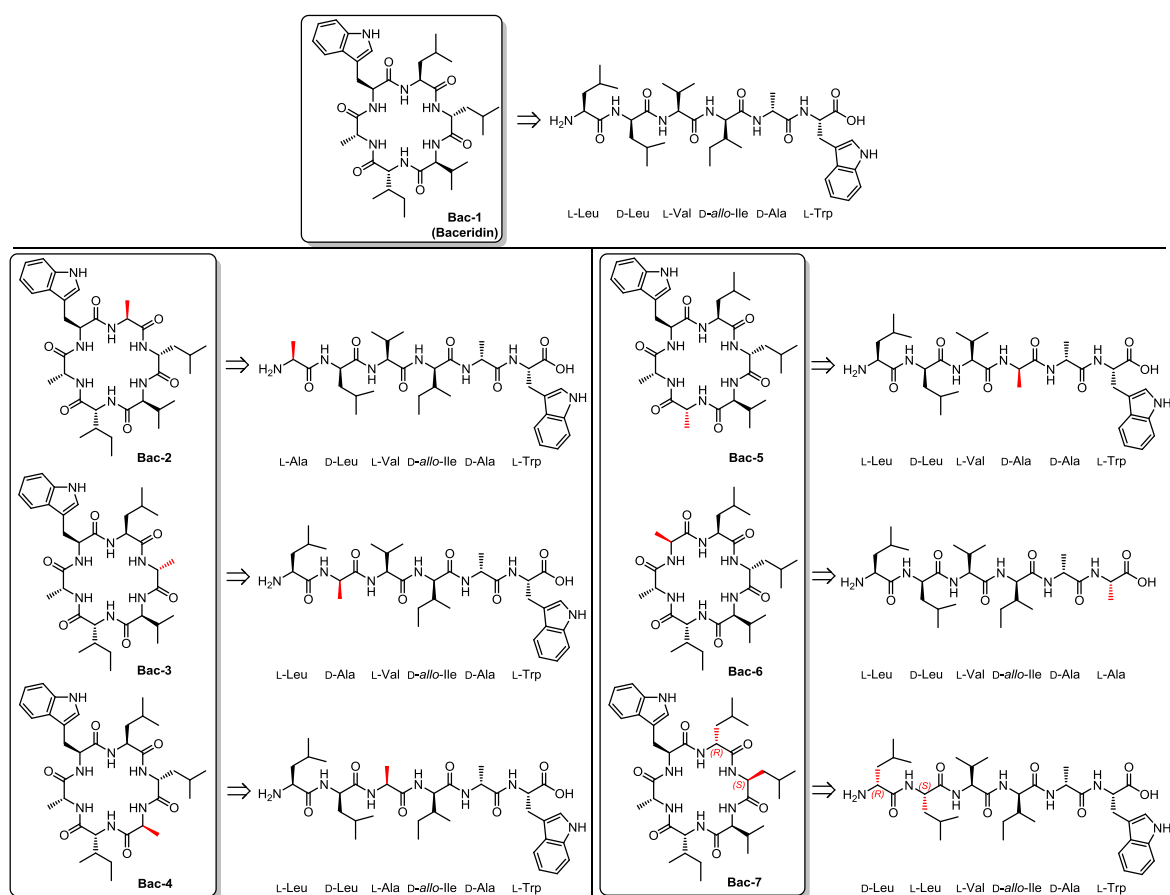


Abbildung 29: Synthesepfeile zur Durchführung eines Alanin-Scans von Baceridin.

Zunächst wurden die linearen Peptide mittels Festphasensynthese synthetisiert und die Zyklisierung mit $\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$, TBTU und Diisopropylethylamin (DIPEA) in Dichlormethan über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach abschließender Reinigung mittels präparativer RP-HPLC konnten die gewünschten zyklischen Hexapeptide in 21-35% Gesamtausbeute erhalten werden. Die Baceridinanaloga (**Bac-2** bis **Bac-7**) sowie das Baceridin (**Bac-1**) wurden im Universitätsklinikum in Tübingen von Prof. N. Malek und Dr. P. Bozko auf Proteasomaktivität untersucht.^[143] Überraschenderweise erwies sich keines der synthetisierten Derivate als aktiver bezüglich der Stabilisierung von p53. Nur das Baceridin zeigte eine Stabilisierung von p53 und somit eine Inhibierung des Proteasoms. In den Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass eine p53-unabhängige apoptotische Abspaltung des PARP-Proteins nur nach Behandlung der Tumorzellen mit Baceridin stattfand. Weiterhin wurde der Einfluss von Baceridin und deren Derivate auf die Aktivierung der Zellzyklushemmung und die Induktion der apoptotischen DNA-Fragmentierung untersucht. Nur das Baceridin ruft die Zellzyklushemmung sowie den p53-unabhängigen Zelltod hervor.

3.3.7 Biosynthese von Baceridin

Da Baceridin aus sechs einzelnen Aminosäuren aufgebaut ist, ist die Biosynthese unter Kondensation der Aminosäuren, wie bei den 2,5-Diketopiperazinen, wahrscheinlich. Mit welcher Aminosäure die Biosynthese startet ist nicht bekannt, jedoch kann ausgehend von der Struktur des azyklischen Baceridins Alanin als Startbaustein angenommen werden (Abbildung 30).

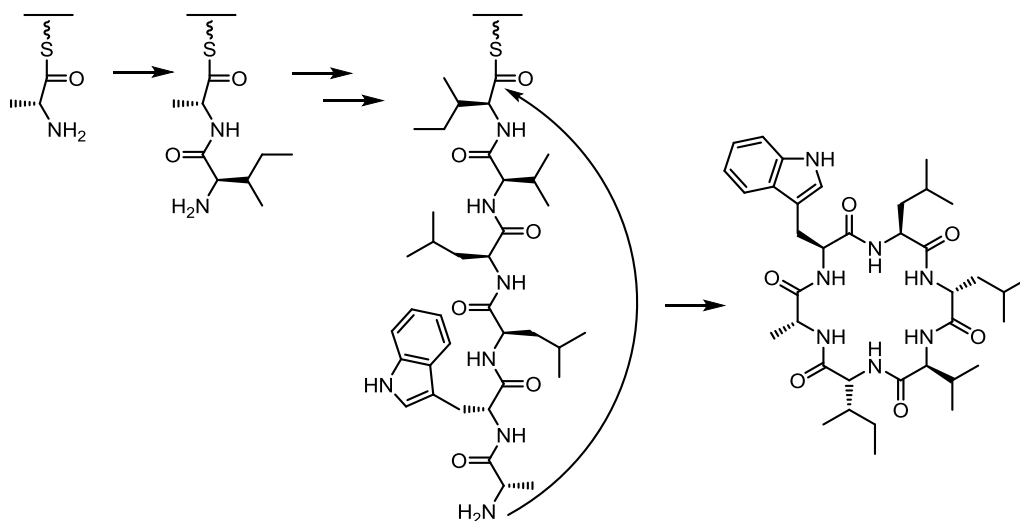


Abbildung 30: Vorgeschlagene Biosynthese von Baceridin.

Nach der Abspaltung durch eine Thioesterase-(TE)-Domäne wird durch Zyklisierung das Baceridin (**D8**) gebildet oder durch Hydrolyse das azyklische Baceridin (**D9**) freigesetzt. Auch das Tetrapeptid (**D10**) sollte biosynthetisch genauso gebildet werden. Die Freisetzung durch eine TE-Domäne und Hydrolyse würde dementsprechend nach vier Aminosäuren statt nach sechs Aminosäuren stattfinden.

3.4 Weitere Sekundärmetaboliten aus *B. cereus* und *M. pulcherrima*

3.4.1 2-Phenylacetamid (**D12**)

Über eine ESI-MS-Messung von Verbindung **D12** wurde ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 136.0765$ und eine Summenformel von C_8H_9NO erhalten. Im Bereich von $\delta_H = 7.30$ ppm bis $\delta_H = 7.39$ ppm des 1H -NMR-Spektrums befand sich ein Multiplett mit einem Integral von 5H, das auf einen mono-substituierten Benzolring schließen lassen konnte (Tabelle 5).

Tabelle 5: NMR-Daten von 2-Phenylacetamid (**D12**) (1H : 400 MHz, in $CDCl_3$).

Atom	δ_H [ppm]	Multiplizität
1-NH ₂	5.35	br. s.
2	3.60	s
4-8	7.32	m

Das breite Singulett bei $\delta_H = 5.35$ ppm konnte den Protonen einer Aminogruppe zugeordnet werden. Da das bei $\delta_H = 3.60$ ppm liegende Singulett mit einem Integral von 2H keine Kopplung mit einem sich in direkter Nachbarschaft befindenden Proton zeigte, konnte auf eine isolierte CH₂-Gruppe geschlossen werden, die zwischen dem Benzolring und der Carboxylgruppe (2-Phenylacetamid) oder der Carbonylgruppe und einer Aminogruppe (2-Aminoacetophenon) liegt. Auf Grund der fehlenden Kopplung zwischen der CH₂-Gruppe und den NH₂-Protonen und mit Hilfe des Inkrementsystems konnte die Substanz als 2-Phenylacetamid angenommen werden (Abbildung 31).

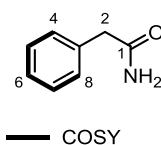


Abbildung 31: Struktur von 2-Phenylacetamid (D12).

Das Amid wurde bereits häufiger in Streptomyceten^[152] gefunden und kommt auch in dem Cyanobakterium *Aphanizomenon flos-aquae*^[153] vor. Des Weiteren konnte es aus dem marinen Schwamm *Callyspongia* sp.^[154] sowie aus Actinomyceten isoliert werden und reguliert das Pflanzenwachstum.^[155] Es wird durch den Abbau von Phenylalanin gebildet (Abbildung 32).

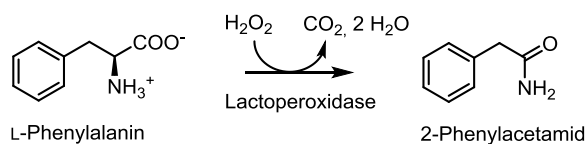


Abbildung 32: Biosynthese von 2-Phenylacetamid.

3.4.2 Tryptophol (D13)

Über eine ESI-MS-Messung von Verbindung **D13** wurde ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 162.0913$ erhalten, was einer Summenformel von $C_{10}H_{11}NO$ entsprechen würde. Im 1H -NMR-Spektrum konnte man im aromatischen Bereich fünf Protonensignale (4-H, 6-H bis 9-H) beobachten (Tabelle 6).

 Tabelle 6: NMR-Daten von Tryptophol (D13) (1H : 400 MHz, ^{13}C : 75 MHz, in CD_3OD).

Atom	δ_C [ppm]	δ_H [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	COSY	HMBC
1	63.8	3.81	t	7.1	2	2
2	30.0	2.97	t	7.6	1	1, 3
3	112.9					
4	123.7	7.07	m			3
5	138.3					
6	112.3	7.32	d	8.1	7	8
7	122.3	7.07	m		6, 8	5, 9
8	119.6	6.99	m		7, 9	6, 10
9	119.4	7.53	d	7.6	8	7
10	129.1					

Vier der Signale zeigten typische ^1H , ^1H -Kopplungen eines disubstituierten Benzolrings, während ein weiteres Signal (4-H) bei $\delta_{\text{H}} = 7.07$ ppm keine Kopplung aufwies. Die ^1H , ^{13}C -HMBC-Kopplungen deuteten auf ein Indolderivat hin. Weitere Signale bei $\delta_{\text{H}} = 3.81$ und 2.97 ppm (1-H, 2-H), die durch eine gegenseitige Kopplung zu jeweils einem Triplet aufgespalten waren, wiesen auf zwei benachbarte Methylengruppen hin. Die Tieffeldverschiebung ließ auf ein elektronenziehendes Heteroatom schließen. Durch den Vergleich mit Spektren schon bekannter Naturstoffe konnte die Struktur als Tryptophol (**D13**, Abbildung 33) identifiziert und durch die molekulare Masse von 161 g/mol bestätigt werden.^[156]

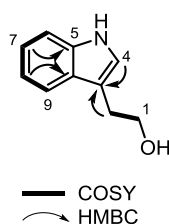


Abbildung 33: Struktur von Tryptophol (**D13**).

Tryptophol wurde bereits von Ehrlich aus einer Tryptophan-Fermentation isoliert und ist gegen grampositive Bakterien und *Candida albicans* schwach aktiv.^[157,158] Es ist ein natürliches Gärprodukt der Hefe^[158] und wird aus Tryptophan gebildet (Abbildung 34).^[159]

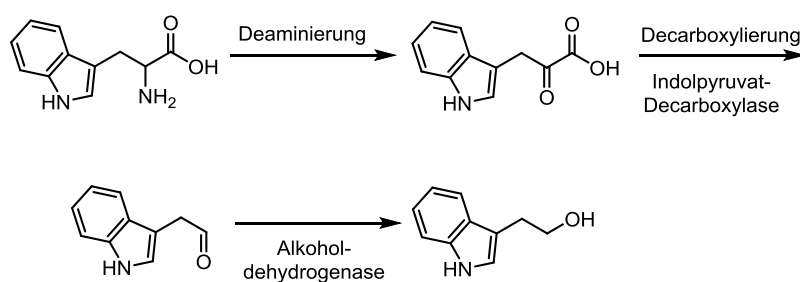


Abbildung 34: Biosynthese von Tryptophol aus Tryptophan.

3.4.3 1H-Indol-3-carbaldehyd (D14)

In der hochauflösenden ESI-MS-Messung der isolierten Fraktion (3.0 mg) aus der 1 L-Kulturaufarbeitung des Hefestamms H24 (Abschnitt 3.1.2), die nicht sauber erhalten werden konnte, konnten vier Signale beobachtet werden. Das Signal mit der stärksten UV-Absorption besaß Maxima bei 206, 244, 260 und 300 nm (Abbildung 35, B) und ein Molekül-Ion $[M+H]^+$ von $m/z = 146.0611$, wodurch eine Summenformel von C_9H_8NO erhalten werden konnte. Auf Grund des UV-Spektrums musste es sich um eine Struktur mit einem aromatischen Anteil handeln. Die Dubletts bei $\delta_H = 7.48$ ppm (8-H) und $\delta_H = 8.16$ ppm (5-H) zusammen mit den Multiplettsignalen bei $\delta_H = 7.24$ ppm (6-H) und $\delta_H = 7.28$ ppm (7-H) entsprachen einem zweifach substituierten Benzolring (Tabelle 7).

Tabelle 7: NMR-Daten von 1H-Indol-3-carbaldehyd (D14) (1H : 400 MHz, ^{13}C : 75 MHz, in CD_3OD).

Atom	δ_C [ppm]	δ_H [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	COSY	HMBC
2	139.8	8.10	s			10
3	120.3	-				
4	125.9	-				
5	122.5	8.16	d	7.7	6	7
6	123.8	7.24	m		5, 7	8
7	125.1	7.28	m		6, 8	5
8	113.3	7.48	d	8.0	7	6
9	139.1	-				
10	187.5	9.89	s			3, 4

Zusammen mit dem Singulett bei $\delta_H = 8.10$ ppm (2-H) ergab sich eine Indolstruktur. Die Aldehydfunktion, die sich als Signal bei $\delta_H = 9.89$ ppm und $\delta_C = 187.5$ ppm zeigte, konnte auf Grund der $^1H,^{13}C$ -HMBC-Kopplung des Aldehydprotons zum Kohlenstoffatom C-3 und C-4 und der Kopplung des 2-H zu C-10 als Substituent an Position C-3 bestimmt werden (Abbildung 35, A).

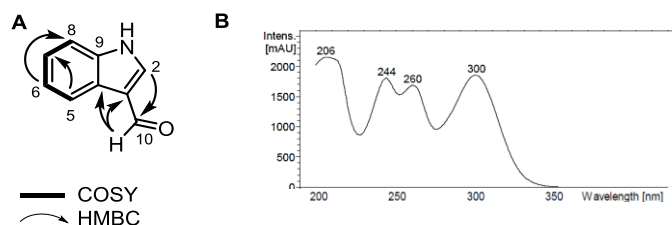


Abbildung 35: (A) 1H-Indol-3-carbaldehyd (D14), (B) UV/Vis-Spektrum von 1H-Indol-3-carbaldehyd.

1*H*-Indol-3-carbaldehyd wurde aus *Murraya exotica*^[160] und *Saccharomyces uvarum*^[161] sowie aus Gerste und Tomatentrieben^[162] isoliert. Es konnte auch in Setzlingen von Erbsen gefunden werden und wirkt dort als lateraler Wachstumsinhibitor der Knospen in der Apikaldominanz.^[163] Es handelt sich um ein Abbauprodukt von Indol-3-essigsäure.^[161]

3.5 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurden ein Bakterium (*Bacillus cereus*) und eine Hefe (*Metschnikowia pulcherrima*) auf Sekundärmetabolite hin untersucht. Aus einer 4 L-Kultur von *B. cereus* konnten zwölf verschiedene Diketopiperazine (**D1** bis **D7**) sowie 2-Phenylacetamid (**D12**), Baceridin (**D8**) und seine azyklische Form (**D9**) isoliert werden (Abbildung 36). Außerdem wurden auch ein Tetrapeptid (**D10**), und ein dem Baceridin ähnliches Peptid (**D11**) isoliert. Es handelte sich dabei um ein Hexapeptid, in dem der Isoleucin-Aminosäurerest durch einen Valinrest ausgetauscht war.

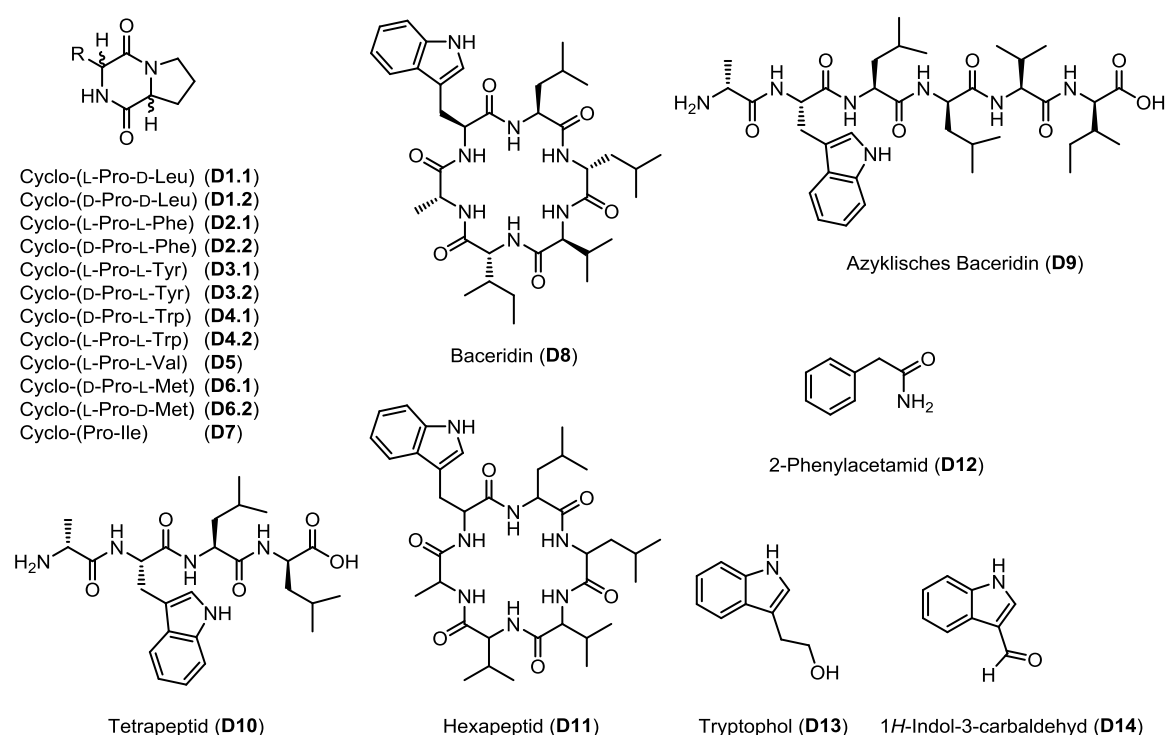


Abbildung 36: Übersicht der isolierten Metaboliten aus *B. cereus* (IBlü-4) und *M. pulcherrima* (H24).

Das zyklische Hexapeptid **D11** und das azyklische Tetrapeptid **D10** waren noch nicht literaturbekannt, zeigten jedoch keine Aktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* K12. Die in dieser Arbeit identifizierten Diketopiperazine sind literaturbekannt und wurden schon oftmals aus Bakterien und Pilzen isoliert. In zahlreichen Veröffentlichungen wurden die Diketopiperazine aus *Bacillus subtilis* isoliert,^[164] bisher ist jedoch nicht bekannt, dass sie aus einem *Bacillus cereus* Stamm identifiziert worden sind. Somit konnte also eine neue Naturstoffquelle für die Diketopiperazine gefunden werden. Aus einer 1 L-Kultur der Hefe *Metschnikowia pulcherrima* konnten ebenfalls literaturbekannte Diketopiperazine (**D1**, **D2**, **D4**) sowie zwei Indolderivate (**D13**, **D14**) isoliert werden. In der Untersuchung einer Kokultur aus dem *B. cereus* und der Hefe *M. pulcherrima* konnte zum Vergleich mit den Reinkulturen eine etwas höhere Produktion von Tryptophol (**D13**) und des Tetrapeptids (**D10**) beobachtet werden. Die Produktion von neuen Sekundärmetaboliten wurde nicht festgestellt und auch die Bildung von Baceridin (**D8**) war annähernd identisch. In einem Alanin-Scan von Baceridin, in dem die Originalverbindung (**Bac-1**) sowie sechs verschiedene zyklische Hexapeptide (**Bac-2** bis **Bac-7**) mittels einer Festphasensynthese mit anschließender Zyklisierung synthetisiert wurden, konnte bei keinem der Derivate in der Untersuchung auf Beeinflussung der Proteasomaktivität^[143] eine höhere Aktivität in Bezug auf die Stabilisierung von p53 beobachtet werden.

Da neben dem bekannten Baceridin (**D8**) das azyklische Baceridin (**D9**) und ein weiteres zyklisches Hexapeptid (**D11**) isoliert werden konnten, sollte ein Up-Scaling der Fermentation erfolgen werden, um weitere interessante Peptide zu finden. Dies konnte leider nicht realisiert werden, da nach der genauen Identifizierung des Stammes IBlü-4 über eine 16S-Sequenzanalyse durch PCR und Sanger-Sequenzierung (durchgeführt von Prof. T. Brüser, Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover) der Organismus als *Bacillus cereus* zugeordnet werden konnte. Dieser wurde in die S2-Sicherheitsstufe eingestuft, wodurch eine große Fermentation am HZI in Braunschweig mit dieser Sicherheitsstufe nicht möglich war.

4 Spirangiene aus So ce90

4.1 Isolierung der Reinsubstanzen

Die Fermentation der Stämme erfolgte unter dem Einsatz von 2% neutralem polymeren Adsorberharz (Amberlite XAD-16). Zur Trennung des XAD-Harzes vom Medium wurde die Kultur über ein Sieb filtriert und mit Wasser gewaschen. Das XAD-Harz wurde anschließend in eine mit Seesand (etwa 4 cm hoch) gefüllte Fritte überführt und mit Methanol und Aceton eluiert. Die Handhabung und die Aufreinigung der Derivate wurde unter Ausschluss von Licht und Hitze durchgeführt, um die Substanzen vor Isomerisierungen und Zersetzung zu schützen. Die Extrakte, die nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhalten wurden, wurden mit Ethylacetat und Wasser ausgeschüttelt, um polare Substanzen wie zum Beispiel Salze abzutrennen. Der Rückstand der Ethylacetatphase wurde in Methanol aufgenommen und mit Heptan ausgeschüttelt, um Lipide zu entfernen. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rohextrakt durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel und RP-HPLC (Eluent A: 5% Acetonitril in H₂O + 0.1% Ameisensäure, B: Acetonitril) aufgereinigt. Zur Analyse mittels einer analytischen UV/Vis-gekoppelten RP-HPLC wurde der Gradient C verwendet (siehe Experimenteller Teil). Die aufgereinigten Spirangienderivate wurden in braunen Kolben und braunen Schraubflaschen in Methanol aufbewahrt und bei -20 °C gelagert.

Zunächst wurde eine 12 L-Fermentation des Stammes *Sorangium cellulosum* untersucht, um die bekannten Spirangien zu reisolieren und einen Überblick über weitere enthaltene Spirangienderivate zu bekommen. Da die Aufreinigung zwei literaturbekannte sowie zwei neue Derivate von Spirangien erbrachte und noch weitere, in Spuren vorhandene, Derivate in der analytischen RP-HPLC des aufgearbeiteten Methanolextrakts zu sehen waren, wurde nochmals eine größere Fermentation von 70 L aufgearbeitet.

4.1.1 Aufreinigung einer 12 L-Fermentation

Der *Sorangium cellulosum* Stamm So ce90 wurde in einem 12 L-Maßstab kultiviert. Aus 78 g Adsorberharz und sechsmaliger Elution mit Methanol sowie fünfmaliger Elution mit Aceton ergab nach Ethylacetat-Extraktion und Methanol/Heptan-Ausschütteln beider Phasen 584 mg Gesamtrohextrakt (B1-1a) (Abbildung 37).

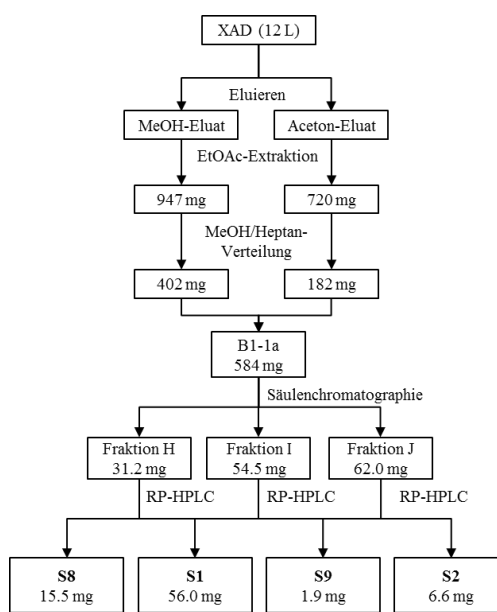


Abbildung 37: Fließschema der Aufreinigung einer 12 L-Kultur von So ce90.

Dieser wurde über eine Säulenchromatographie aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, von 14:1, auf 1:1, auf 1:9). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe einer analytischen HPLC analysiert. Die Spektren der Fraktionen H-J zeigten eine Vielzahl an Peaks mit einem charakteristischen UV/Vis-Profil, welches auch in den literaturbekannten Spirangien A und B zu beobachten ist ($\lambda_{\text{max}} = 350, 333, 317, 304 \text{ nm}$). Diese Fraktionen wurden mittels einer präparativen RP-HPLC weiter aufgereinigt (Gradient: 35% B für 5 min, von 35 zu 75% B in 5 min, 75% B für 5 min, von 75 zu 100% in 15 min, 100% B für 10 min). Die vier erhaltenen Hauptfraktionen aus jedem Lauf wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Es konnten Spirangien L (**S8**, $t_R = 31.3 \text{ min}$, 15.5 mg), Spirangien A (**S1**, $t_R = 32.0 \text{ min}$, 56.0 mg), Spirangien M (**S9**, $t_R = 33.7 \text{ min}$, 1.9 mg) und Spirangien B (**S2**, $t_R = 34.8 \text{ min}$, 6.6 mg) erhalten werden.

4.1.2 Aufreinigung einer 70 L-Fermentation

Das Adsorberharz (727 g) einer 70 L-Fermentation des *Sorangium cellulosum* wurde viermal mit Methanol und anschließend mit Aceton eluiert. Nach Extraktion mit Ethylacetat und Methanol/Heptan-Ausschütteln konnten 3.02 g Rohextrakt (B2-1a) erhalten werden (Abbildung 38).

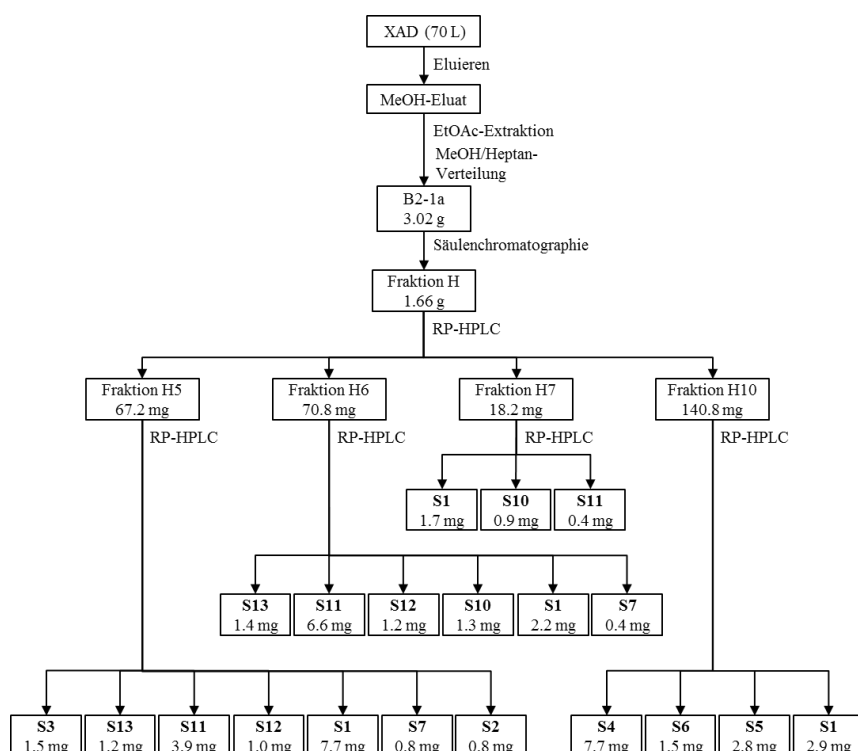


Abbildung 38: Fließschema der Aufreinigung einer 70 L-Kultur von So ce90.

In Abbildung 39 sind das UV-Chromatogramm und die Massenspuren der HPLC-MS-Analyse abgebildet. Die Spirangiene konnten durch ihr charakteristisches UV-Spektrum leicht identifiziert werden. Da die Molekülionenpeaks im negativen Modus der Massespur eindeutiger zu bestimmen waren, sind die Molekülionenpeaks in $[M-H]^-$ angegeben.

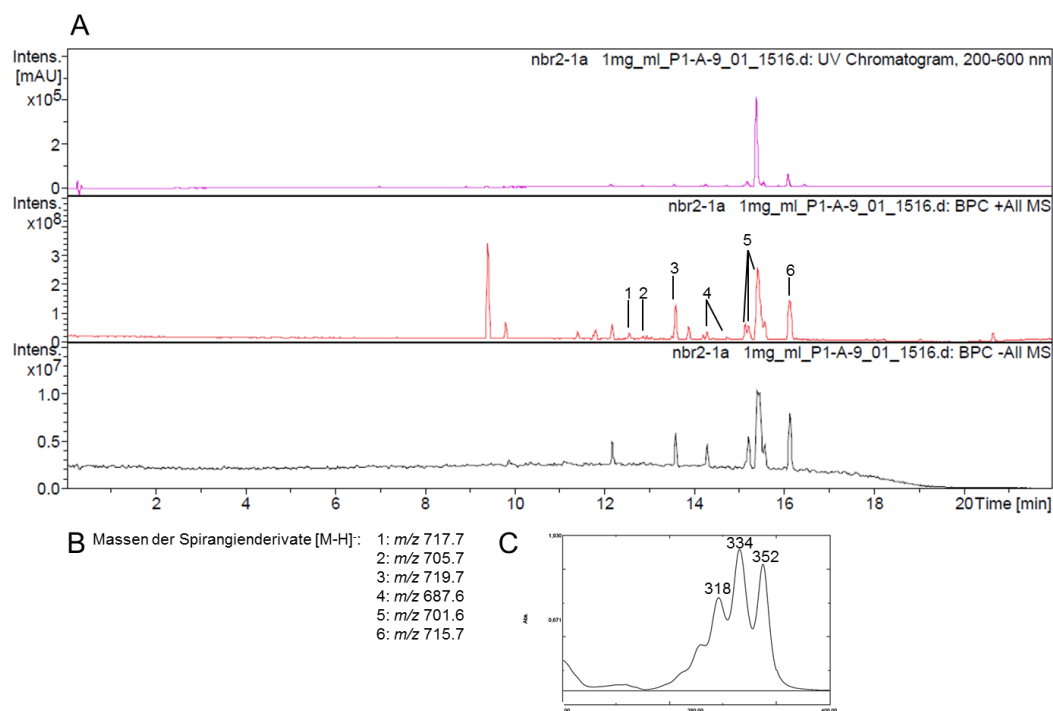


Abbildung 39: Analyse des Rohextraktes, (A) UV- und BPC-Chromatogramm mit markierten Spiranginderivaten, (B) Massen der ausgewählten Spiranginderivate, (C) Beispielhaftes UV-Spektrum eines Spiranginderivats.

Die Aufreinigung des Rohextraktes (B2-1a) mittels Säulenchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1) ergab acht Fraktionen, die mit Hilfe der analytischen HPLC analysiert wurden. In den Fraktionen B bis G wurden durch Vergleich mit den aus den 15 L-Fermentation gemessenen HPLC-Spektren hauptsächlich die schon isolierten Spirangiene A (**S1**) und B (**S2**) vermutet. Die letzte Fraktion (Fraktion H, 1.66 g), die das meiste Material enthielt und eine Vielzahl neuer Derivate vermuten ließ, wurde über eine weitere Säulenchromatographie aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, von 8:1, auf 5:1, auf 1:1, auf 1:9). Nach Analyse durch eine UV/Vis-gekoppelte analytische HPLC wurden die Fraktionen H5 (67.2 mg), H6 (70.8 mg), H7 (18.2 mg) und H10 (140.8 mg) als die Fraktionen mit der am vielversprechendsten Menge an unterschiedlichen Derivaten angenommen. Sie wurden weiter über eine präparative RP-HPLC aufgereinigt und die isolierten Naturstoffe im Vakuum getrocknet.

Die Aufreinigung von Fraktion H5 mit einer RP-HPLC (Gradient: von 30 zu 65% B in 2 min, von 65 zu 100% B in 28 min, 100% B für 5 min) ergab Spirangien G (**S3**, $t_R = 13.4$ min, 1.5 mg), Spirangien Q (**S13**, $t_R = 16.6$ min, 1.2 mg), Spirangien O (**S11**, $t_R = 17.2$ min, 3.9 mg), Spirangien P (**S12**, $t_R = 19.8$ min, 1.0 mg), Spirangien A (**S1**,

$t_R = 27.1$ min, 7.7 mg), Spirangien K (**S7**, $t_R = 27.8$ min, 0.8 mg) und Spirangien B (**S2**, $t_R = 30.4$ min, 0.8 mg).

Mit der Aufreinigung der Fraktion H6 konnten mittels RP-HPLC (Gradient: von 70 zu 90% B in 10 min, von 90 zu 100% B in 20 min, 100% B für 5 min) Spirangien Q (**S13**, $t_R = 12.6$ min, 1.4 mg), Spirangien O (**S11**, $t_R = 13.0$ min, 6.6 mg), Spirangien P (**S12**, $t_R = 14.8$ min, 1.2 mg), Spirangien N (**S10**, $t_R = 15.3$ min, 1.3 mg), Spirangien A (**S1**, $t_R = 20.0$ min, 2.2 mg) und Spirangien K (**S7**, $t_R = 20.6$ min, 0.4 mg) isoliert werden.

Die Aufreinigung der Fraktion H7 mit Hilfe einer RP-HPLC (Gradient: von 30 zu 50% B in 5 min, von 50 zu 100% B in 35 min, 100% B für 5 min), ergab Spirangien A (**S1**, $t_R = 28.4$ min, 1.7 mg), Spirangien N (**S10**, $t_R = 32.4$ min, 0.9 mg) und Spirangien O (**S11**, $t_R = 38.8$ min, 0.4 mg).

Mit der Aufreinigung der Fraktion H10 konnten mittels RP-HPLC (Gradient: von 80 zu 90% B in 10 min, von 90 zu 94% B in 10 min, von 94 zu 100% B in 1 min, 100% B für 1 min) Spirangien H (**S4**, $t_R = 14.1$ min, 7.7 mg), Spirangien J (**S6**, $t_R = 15.0$ min, 1.5 mg), Spirangien I (**S5**, $t_R = 16.7$ min, 2.8 mg) und Spirangien A (**S1**, $t_R = 17.9$ min, 2.9 mg) erhalten werden.

4.2 Strukturaufklärung der Spirangiene A (**S1**) und B (**S2**)

Die Summenformel von Spirangien A (**S1**), $C_{41}H_{66}O_9$, wurde durch eine ESI-HRMS-Messung erhalten ($[M+Na]^+ m/z = 725.4607$). Die ESI-HRMS-Analyse von Spirangien B (**S2**) ergab eine Summenformel von $C_{42}H_{68}O_9$ ($[M+Na]^+ m/z = 739.4753$). Bei Spirangien A (**S1**) handelte es sich um die Hauptverbindung des Extraktes. Der Vergleich der 1H -NMR- und der ^{13}C -NMR-Spektren mit den literaturbekannten Spektren^[95] ergab eine Übereinstimmung. Das zweite Derivat konnte als Spirangien B (**S2**) identifiziert werden. An der endständigen Position der Alkylkette von Spirangien B (**S2**) befand sich anstelle einer Methylgruppe eine Ethylgruppe mit einem CH_2 -Signal von $\delta_H = 2.02$ ppm und einem CH_3 -Signal von $\delta_H = 0.96$ ppm (Tabelle 8). Die 1H , 1H -COSY- und 1H , ^{13}C -HMBC-Spektren konnten die Struktur bestätigen.

Tabelle 8: NMR-Daten der Spirangiene A (S1) und B (S2) (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz, in CD_3OD).

Verbindung	S1		S2	
Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
1	174.7	-	174.4 ^[a]	-
2	42.1	(a) 2.56, dd (14.6, 8.0) (b) 2.41, dd (15.2, 5.1)	42.1 ^[b]	2.54, br. s. 2.40, br. s.
3	74.9	4.62, td (8.6, 5.4)	75.3	4.62, m
4	131.4	5.30, t (10.1)	130.9	5.27, t (10.1)
5	134.0	6.37, t (11.2)	133.7	6.28, t (11.1)
6	129.2	6.66, dd (14.4, 11.7)	128.1	6.67, m
7	132.1	6.86, dd (14.4, 11.4)	136.7	6.38, m
8	130.4	6.11, t (11.2)	128.9	6.37, m
9	132.3	6.16, m	135.7	6.39, m
10	129.7	6.79, dd (14.4, 11.4)	134.7	6.32, dd (14.6, 10.6)
11	131.0	6.60, dd (14.4, 11.6)	130.3	6.60, dd (14.1, 11.6)
12	130.2	6.18, m	130.2	6.11, t (11.1)
13	134.8	5.64, t (10.6)	134.3	5.61, t (10.6)
14	36.3	2.96, dqd (10.3, 6.8, 2.8)	36.3	2.94, m
15	76.7	3.56, dd (9.8, 2.3)	76.7	3.56, d (11.1)
16	40.2	1.60, m	40.2	1.60, m
17	75.3	3.59, dd (10.4, 0.8)	75.3	3.60, d (10.6)
18	25.8	1.92, m	25.8	1.93, m
19	37.5	(a) 1.76, m	37.5	1.76, d (2.5)
19		(b) 1.67, dt (13.2, 3.6)	37.5	1.67, d (10.1)
20	71.2	3.39, t (2.8)	71.2	3.39, m
21	99.6	-	99.6	-
22	34.1	(a) 2.03, dd (13.1, 4.7) (b) 1.37, t (12.5)	34.1	2.05, m 1.37, m
23	78.9	3.64, m	79.0	3.64, m
24	33.0	2.12, qdd (6.5, 4.3, 1.8)	33.1	2.12, m
25	72.6	3.69, dd (10.3, 1.7)	72.6	3.69, m
26	37.9	1.83, dqd (10.5, 6.9, 0.8)	38.0	1.83, m
27	76.3	3.65, m	76.4	3.65, m
28	35.5	1.73, m	35.4	1.73, m
29	46.2	(a) 2.67, d (13.1) (b) 1.60, m	46.2	2.68, d (12.1) 1.60, m
30	136.1	-	134.7	-
31	121.3	5.22, q (6.5)	129.6	5.15, t (6.5)
32	13.7	1.60, m	22.3	2.02, m
33	-	-	14.9	0.96, t (7.3)
14-Me	19.8	1.12, d (6.8)	19.8	1.11, d (7.1)
16-Me	9.6	0.79, d (6.8)	9.6	0.80, d (7.1)
18-Me	18.2	0.75, d (6.7)	18.2	0.76, d (6.5)
24-Me	4.2	0.77, d (6.8)	4.3	0.78, d (6.5)
26-Me	8.1	0.81, d (7.1)	8.1	0.81, d (7.1)
28-Me	15.7	0.71, d (6.7)	15.7	0.72, d (6.5)
30-Me	16.0	1.60, m	16.1	1.60, m
3-OMe	56.7	3.26, s	56.6	3.26, s
23-OMe	55.6	3.34, s	55.6	3.34, br. s.

[a] Daten aus ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR, [b] Daten aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR.

Auf Grund der vollständigen Übereinstimmung der ^1H -NMR-Spektren von Spirangien A (**S1**) und Spirangien B (**S2**) mit den Literaturspektren^[95] konnte auch von einer identischen Stereochemie ausgegangen werden (Abbildung 40).

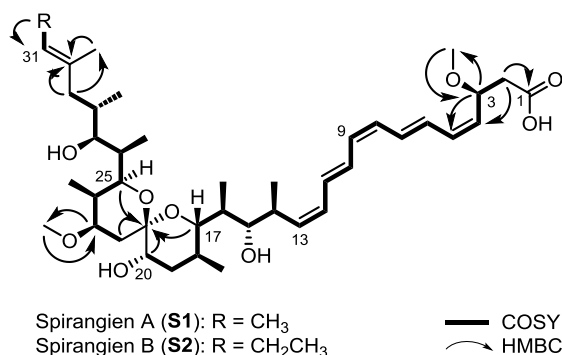


Abbildung 40: Struktur der Spirangiene A (**S1**) und B (**S2**).

Bei Spirangien B sowie auch bei den nachfolgend diskutierten Spirangienderivaten waren häufig die Protonensignale von 2-H und 3-H und auch die ^{13}C -NMR-Signale der Kohlenstoffe C-1, C-2 und C-3 in den Spektren nicht zu beobachten. Diese wurden über ^1H , ^1H -COSY- und ^1H , ^{13}C -NMR-Kopplungen bestimmt. Das Fehlen der Protonensignale könnte durch den Austausch der Protonen mit dem deuterierten Lösungsmittel während der NMR-Messung zu erklären sein.

4.3 Strukturaufklärung der Spirangienderivate

Bei der Strukturaufklärung der Spirangienderivate wurde nur auf die wesentlichen Unterschiede der spektroskopischen Daten zu den literaturbekannten Spirangien A und B eingegangen. Die nicht aufgezeigten Signale der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren waren weitgehend identisch mit denen der bekannten Spirangiene A (**S1**) und B (**S2**). Die komplette Auflistung der NMR-Daten befindet sich im Abschnitt 6.2.5.

4.3.1 Spirangien G (**S3**)

Die Summenformel von Spirangien G (**S3**), C₄₁H₆₇O₁₀, wurde durch eine ESI-HRMS-Messung erhalten ($[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 741.4550$). Die NMR-Spektren von Spirangien G (**S3**) waren denen des isolierten Spirangien A (**S1**) sehr ähnlich. Das Proton 32-H war weiter ins Tieffeld (CH₂: $\delta_{\text{Ha}} = 4.12$, dd, $J = 12.2, 7.1$ Hz, 1H; $\delta_{\text{Hb}} = 4.08$, dd, $J = 12.2, 7.1$ Hz,

¹H) verschoben und das Proton 31-H ($\delta_{\text{H}} = 5.37$ ppm) war zu einem Triplet aufgespalten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (S1) und G (S3) (¹H: 700 MHz, ¹³C: 176 MHz, in CD₃OD).

Verbindung	S1		S3	
Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
30	136.1	-	139.0	-
31	121.3	5.22, q (6.5)	126.8	5.37, t (6.7)
32	13.7	1.60, m	59.6	(a) 4.12, dd (12.2, 7.1) (b) 4.08, dd (12.2, 7.1)

Ein zusätzliches Sauerstoffatom in der Summenformel ließ zusammenfassend auf die Anwesenheit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an C-32 schließen (Abbildung 41).

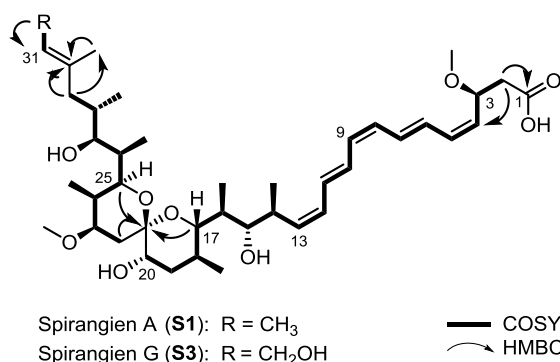


Abbildung 41: Struktur der Spirangiene A (S1) und G (S3).

4.3.2 Spirangiene H (S4) und I (S5)

Die Summenformeln der Spirangiene H (S4) und I (S5) wurden über eine ESI-HRMS-Messung erhalten (Spirangien H (S4): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 711.4436$, C₄₀H₆₄O₉; Spirangien I (S5): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 725.4590$, C₄₁H₆₆O₉). Das ¹H-NMR-Spektrum von Spirangien H (S4) zeigte eine Ähnlichkeit zu dem von Spirangien A (S1), während das von Spirangien I (S5) ähnlich zu dem von Spirangien B (S2) war. Das Fehlen des Signals der CH₃-Gruppe der Methoxygruppe an C-3 bei $\delta_{\text{H}} = 3.26$ ppm im ¹H-NMR-Spektrum von Spirangien H (S4) und I (S5) führte zu dem Schluss, dass sich eine Hydroxylgruppe an der C-3 Position befindet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (**S1**), H (**S4**) und I (**S5**) (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz^[a], in CD_3OD).

Verbindung	S1		S4		S5	
Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
3	74.9	4.62, td (8.6, 5.4)	65.8	5.02, q (6.7)	75.7	4.63, m
4	131.4	5.30, t (10.1)	134.0	5.45, t (9.8)	132.3	5.30, t (10.0)
5	134.0	6.37, t (11.2)	131.3	6.19, m	133.9	6.36, t (11.2)
3-OMe	56.7	3.26, s	-	-	-	-

[a] Das ^{13}C NMR von **S5** wurde bei 126 MHz gemessen.

Die konjugierte Pentaen-Doppelbindungskette von Spirangien H (**S4**) und I (**S5**) war in der *E/Z*-Konfiguration identisch zu Spirangien A (**S1**) und B (**S2**), da im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 5.35\text{--}6.90$ ppm des ^1H -NMRs die jeweiligen Signale deckungsgleich waren (Abbildung 42).

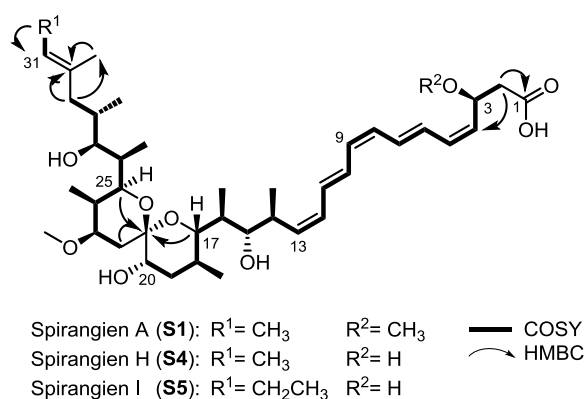


Abbildung 42: Struktur der Spirangiene A (**S1**), H (**S4**) und I (**S5**).

4.3.3 Spirangien J (**S6**) und K (**S7**)

Die Summenformeln von Spirangien J (**S6**) und Spirangien K (**S7**) wurden über eine ESI-HRMS-Messung erhalten (Spirangien J (**S6**): $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 689.4616, $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{O}_9$, Spirangien K (**S7**): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 725.4586, $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{NaO}_9$). Die ^1H -NMR-Spektren von Spirangien J (**S6**) und K (**S7**) zeigten eine Ähnlichkeit zu dem von Spirangien A (**S1**), mit Ausnahme der Doppelbindungskette, dessen Signale unterschiedlich in der Verschiebung und der Aufspaltung waren (Tabelle 11).

Tabelle 11: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (**S1**), J (**S6**) und K (**S7**) (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz,^[a] in CD_3OD).

Verbindung	S1		S6		S7	
	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
3	74.9	4.62, td (8.6, 5.4)	70.1 ^[b]	4.57 ^[c]	80.6 ^[c]	4.10, q (5.8)
4	131.4	5.30, t (10.1)	136.1	5.76, dd (14.9, 5.8)	134.1	5.60, m
5	134.0	6.37, t (11.2)	132.1	6.33, m	134.1	6.35, m
6	129.2	6.66, dd (14.4, 11.7)	133.5	6.26, m	133.1	6.26, m
7	132.1	6.86, dd (14.4, 11.4)	134.7	6.31, m	135.2	6.33, m
8	130.4	6.11, t (11.2)	134.9	6.29, m	134.1	6.32, m
9	132.3	6.16, m	135.0	6.37, m	135.3	6.38, m
10	129.7	6.79, dd (14.4, 11.4)	134.2	6.30, m	134.7	6.29, m
11	131.0	6.60, dd (14.4, 11.6)	129.9	6.57, dd (14.6, 11.5)	130.0	6.58, dd (14.4, 11.6)
12	130.2	6.18, m	130.2	6.10, t (11.2)	130.2	6.10, t (11.2)
13	134.8	5.64, t (10.6)	134.0	5.59, t (10.6)	134.1	5.57, m

[a] Das ^{13}C -NMR von **S6** wurde bei 126 MHz gemessen, [b] Daten aus ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR, [c] Daten aus ^1H , ^1H -COSY-NMR.

Das fehlende Signal der CH_3 -Gruppe der Methoxygruppe an C-3 bei $\delta_{\text{H}} = 3.26$ ppm im ^1H -NMR-Spektrum und bei $\delta_{\text{C}} = 56.7$ ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum von Spirangien K (**S7**) führte zu dem Schluss, dass sich eine Hydroxylgruppe an der C-3 Position befindet. Um die Doppelbindungskonfiguration bestimmen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Schwalbe aus Frankfurt 900 MHz-NMR-Spektren (^1H -NMR, ^1H , ^1H -COSY und ^1H , ^{13}C -HSQC) von Spirangien J (**S6**) aufgenommen (Abbildung 43). Nach Erhalt der Konfiguration konnte diese auch auf Spirangien K (**S7**) übertragen werden, da die Signale der Doppelbindungskette von beiden Derivaten identisch ist. Durch die Verbesserung der Aufspaltung der Signale konnten die Signale eindeutig zugeordnet und ein Konfigurationsvorschlag gemacht werden.

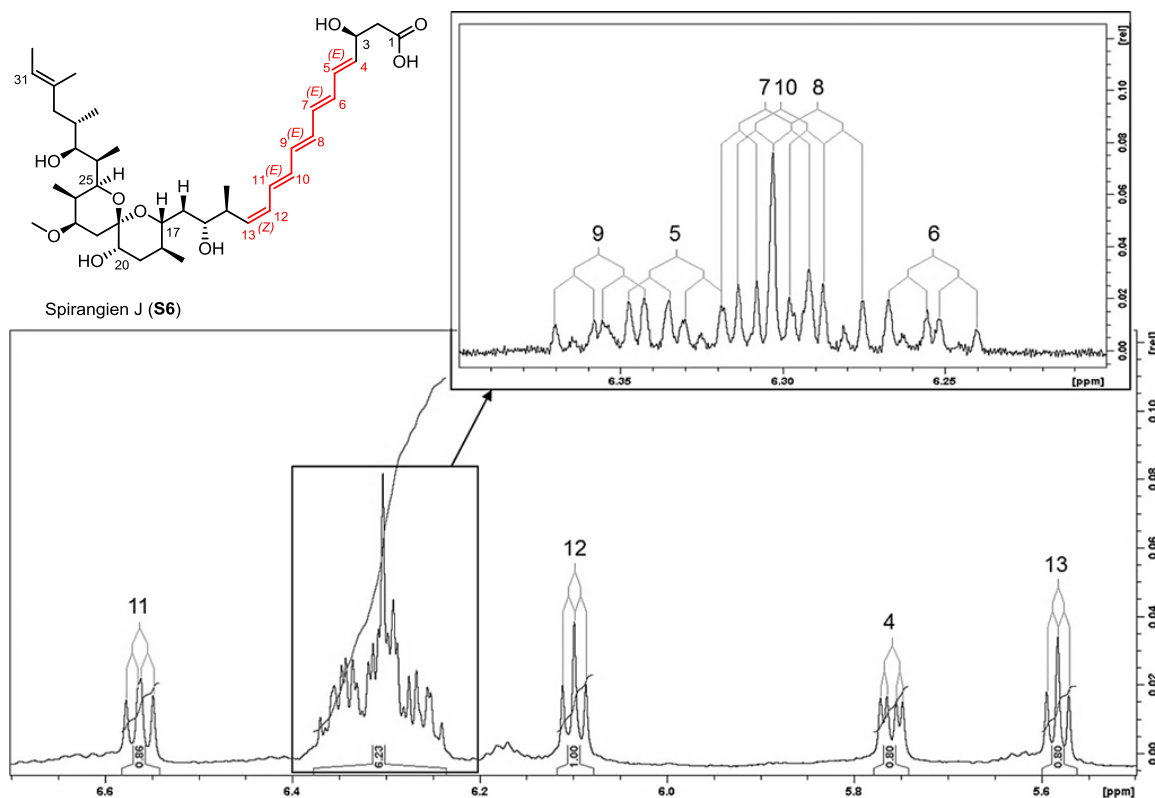


Abbildung 43: ^1H -NMR-Ausschnitt (5.5-6.7 ppm) von Spirangien J (S6) (900 MHz, in CD_3OD), Ausschnitt von 6.2-6.4 ppm: LB: -1.6, GB: 0.3).

Basierend auf den vicinalen Kopplungskonstanten der $\Delta^{4,5}$ -, $\Delta^{6,7}$ -, $\Delta^{8,9}$ - und $\Delta^{10,11}$ -Doppelbindungen von etwa 14 Hz wurden diese als *E*-konfiguriert bestimmt. Die Konfiguration von der $\Delta^{12,13}$ -Doppelbindung mit einer Kopplungskonstante war 11.2 Hz *Z*-konfiguriert (Abbildung 44).

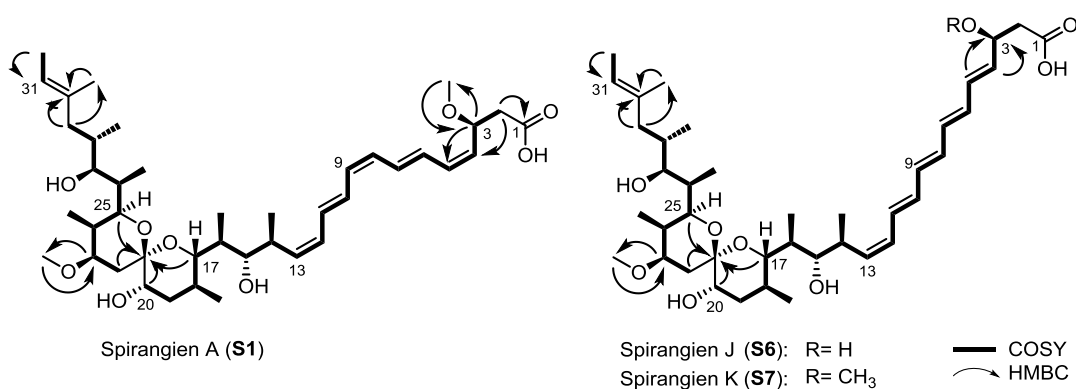


Abbildung 44: Struktur der Spirangiene A (S1), J (S6) und K (S7).

4.3.4 Spirangien L (S8) und M (S9)

Die ^1H -NMR-Spektren der zwei Derivate Spirangien L (S8) und Spirangien M (S9), deren Summenformeln über eine ESI-HRMS-Messung erhalten wurden (Spirangien L (8): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 725.4583$, $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{O}_9$; Spirangien M (9): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 717.4956$, $\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{O}_9$), wiesen eine verschiedene *E/Z*-Doppelbindungskonfiguration im Vergleich zu Spirangien A (S1) und B (S2) auf, da die entsprechenden Signale im ^1H -NMR andere Verschiebungen und Aufspaltungen zeigten (Abbildung 45).

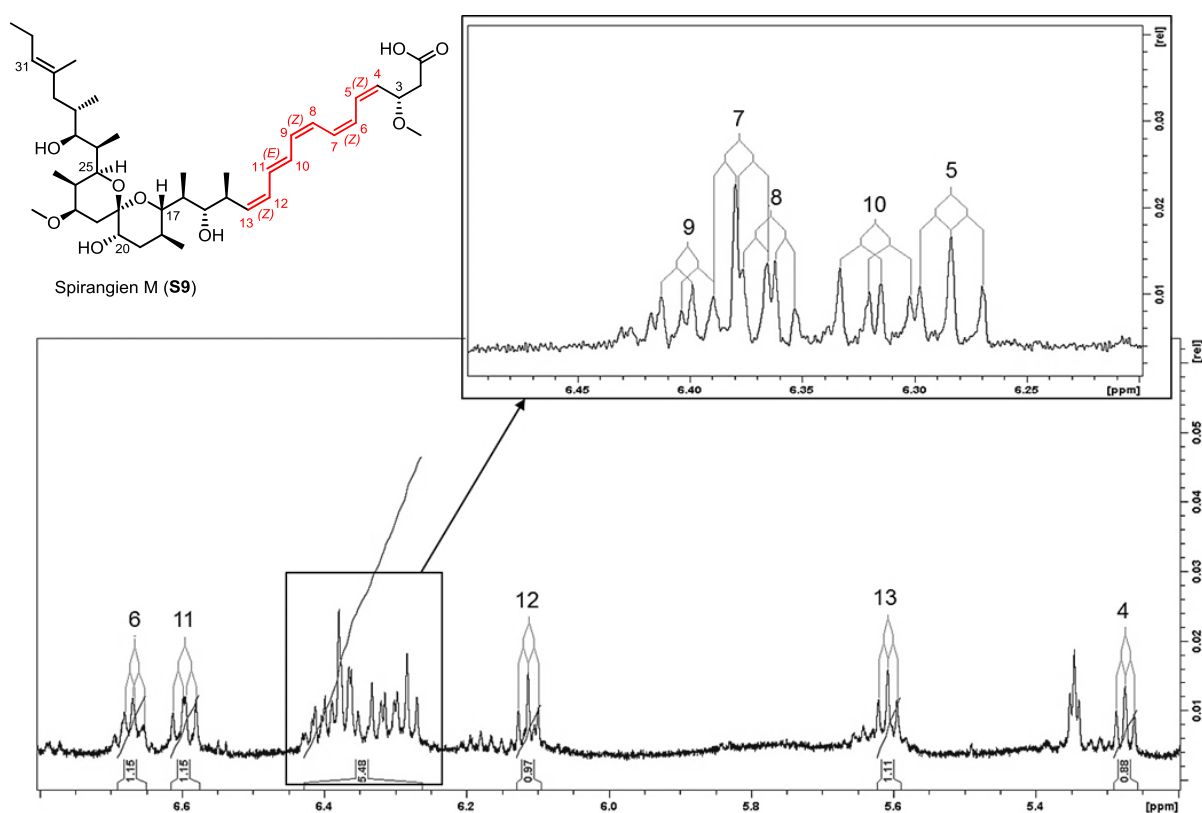
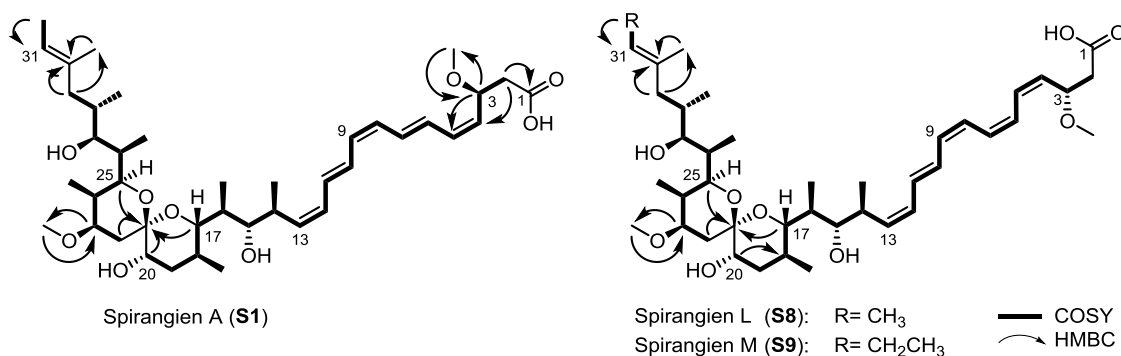


Abbildung 45. ^1H -NMR-Ausschnitt (5.2-6.8 ppm) von Spirangien M (S9) (900 MHz, in CD_3OD), Ausschnitt von 6.2-6.5 ppm: LB: -1.9, GB: 0.3.

Mit Hilfe einer NMR-Messung an einem 900 MHz-Gerät (Arbeitsgruppe Schwalbe, Frankfurt) konnten die Doppelbindungen über $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Kopplungen sowie $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Kopplungen bestimmt werden. Die Konfigurationen der $\Delta^{4,5}$ -, $\Delta^{6,7}$ -, $\Delta^{8,9}$ - und $\Delta^{12,13}$ -Doppelbindungen wurden als *Z* vorgeschlagen, die $\Delta^{10,11}$ -Doppelbindung als *E*-konfiguriert (Abbildung 46).

Abbildung 46: Strukturen der Spirangiene A (**S1**), L (**S8**) und M (**S9**).Tabelle 12: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (**S1**), L (**S8**) und M (**S9**) (¹H: 700 MHz,^[a] ¹³C: 176 MHz,^[b] in CD₃OD).

Verbindung	S1		S8		S9	
	δ_C [ppm]	δ_H [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_C [ppm]	δ_H [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_C [ppm]	δ_H [ppm], Multiplizität [J in Hz]
3	74.9	4.62, td (8.6, 5.4)	74.9	4.61, td (8.6, 4.8)	75.3	4.62, m
4	131.4	5.30, t (10.1)	130.9	5.26, t (10.1)	130.9	5.27, t (10.1)
5	134.0	6.37, t (11.2)	134.0	6.30, m	133.7	6.28, t (11.1)
6	129.2	6.66, dd (14.4, 11.7)	128.5	6.64, m	128.1	6.67, m
7	132.1	6.86, dd (14.4, 11.4)	137.1	6.38, m	136.7	6.38, m
8	130.4	6.11, t (11.2)	128.5	6.37, m	128.9	6.37, m
9	132.3	6.16, m	136.0	6.39, m	135.7	6.39, m
10	129.7	6.79, dd (14.4, 11.4)	134.6	6.32, m	134.7	6.32, dd (14.6, 10.6)
11	131.0	6.60, dd (14.4, 11.6)	130.4	6.60, m	130.3	6.60, dd (14.1, 11.6)
12	130.2	6.18, m	130.2	6.61, t (11.2)	130.2	6.11, t (11.1)
13	134.8	5.64, t (10.6)	134.4	5.61, t (10.6)	134.3	5.61, t (10.6)

[a] Das ¹H-NMR von **S9** wurde bei 900 MHz gemessen, [b] Das ¹³C-NMR von **S8** wurde bei 126 MHz gemessen.

4.3.5 Spirangien N (**S10**)

Die Summenformel von Spirangien N (**S10**) wurde über eine ESI-HRMS-Messung erhalten ($[M+Na]^+$ m/z = 689.4623, C₄₀H₆₅O₉). Das ¹H-NMR-Spektrum von Spirangien N (**S10**) zeigte eine Ähnlichkeit zu dem von Spirangien A (**S1**). Das fehlende Signal bei δ_C = 56.7 ppm im ¹H-NMR von Spirangien N (**S10**) ließ auf die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe an C-23 anstatt einer Methoxygruppe schließen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (S1) und N (S10) (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz, in CD_3OD).

Verbindung	S1		S10	
Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
17	75.3	3.59, dd (10.4, 0.8)	75.2	3.59, dd (10.3, 0.6)
18	25.8	1.92, m	25.8	1.91, m
19	37.5	(a) 1.76, m (b) 1.67, dt (13.2, 3.6)	37.6	(a) 1.75, m (b) 1.67, m
20	71.2	3.39, t (2.8)	71.2	3.39, t (2.8)
21	99.6	-	99.6	-
22	34.1	(a) 2.03, dd (13.1, 4.7) (b) 1.37, t (12.5)	36.2	(a) 1.96, dd (12.9, 4.7) (b) 1.42, t (12.6)
23	78.9	3.64, m	69.4	4.06, dt (12.0, 4.7)
24	33.0	2.12, qdd (6.5, 4.3, 1.8)	37.0	1.91, m
25	72.6	3.69, dd (10.3, 1.7)	72.8	3.71, dd (10.1, 1.7)

Die konjugierte Pentaen-Doppelbindungskette war in der *E/Z*-Konfiguration identisch zu Spirangien A (S1), da im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 5.35\text{--}6.90$ ppm des ^1H -NMRs die jeweiligen Signale deckungsgleich waren. Die Struktur des Spirangienderivats S10 ist vergleichend zu Spirangien A (S1) in Abbildung 47 dargestellt.

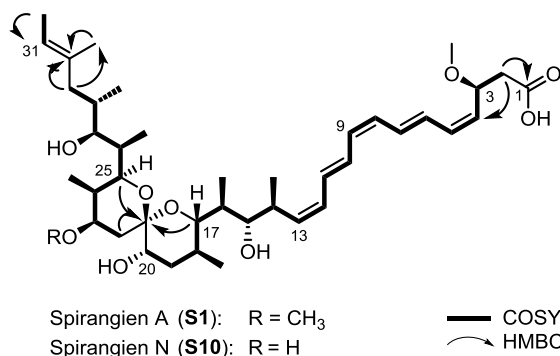


Abbildung 47: Strukturen der Spirangiene A (S1) und N (S10).

4.3.6 Spirangien O (S11) und P (S12)

Die Summenformeln wurden über eine ESI-HRMS-Messung bestimmt (Spirangien O (S11): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 703.4787$, $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{O}_9$; Spirangien P (S12): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 739.4737$, $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{NaO}_9$). Spirangien O (S11) besaß die gleiche molare Masse wie Spirangien A (S1), während die von Spirangien P (S12) identisch zu der von Spirangien B (S2) war. Die ^1H -NMR-Signale im Bereich zwischen 3.35 und 3.85 ppm waren verschieden zu denen von Spirangien A (S1) bzw. B (S2) (Abbildung 48).

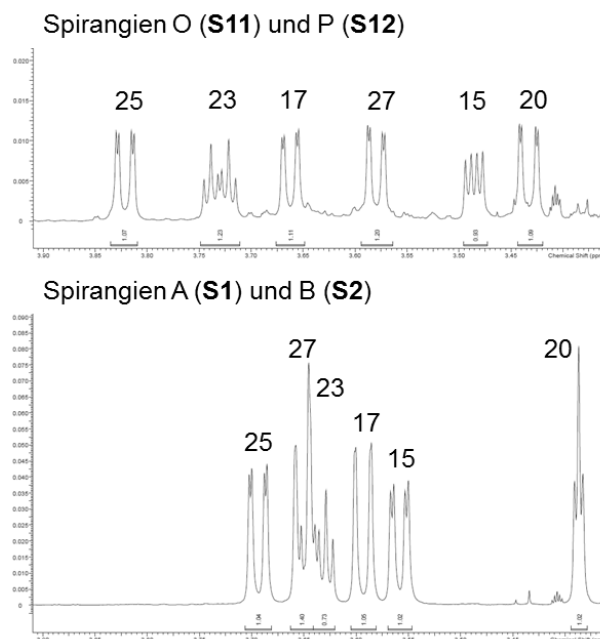


Abbildung 48: ^1H -NMR-Ausschnitt (3.35-3.90 ppm) von Spirangien O (S11) und P (S12) (oben, 700 MHz, in CD_3OD) und Spirangien A (S1) und B (S2) (unten, 700 MHz, in CD_3OD).

Die Signale konnten den Protonen zugeordnet werden, die sich in der Spiroketal-Einheit der Verbindung befinden. Die Vermutung war, dass die Konfiguration an C-20 entgegengesetzt zu der von Spirangien A (S1) ist, da die Hydroxylgruppe nicht während der Polyketidbiosynthese gebildet wird, sondern durch eine Post-PKS-Oxidation entsteht. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde die Murata-Methode^[103,106] angewendet. Es handelt sich um eine Methode, mit der sowohl die Konfiguration als auch die Konformation basierend auf Kohlenstoff-Protonen-Kopplungskonstanten ($^2,3J_{\text{C,H}}$) und Proton-Proton-Kopplungskonstanten ($^3J_{\text{H,H}}$) bestimmt werden kann. Dazu wurde ein HSQC-HECADE-Spektrum von Spirangien O (S11) aufgenommen. Die $^2J_{\text{C20},19\text{Ha}}$ -Kopplungskonstante lag bei 6 Hz, wodurch auf eine *gauche*-Beziehung zwischen 19- H_a und 20-OH hingewiesen wurde (Abbildung 49). Die $^2J_{\text{C20},19\text{Hb}}$ -Kopplungskonstante von 8 Hz führte ebenfalls zu einer *gauche*-Beziehung. Daraus konnte eine äquatoriale Stellung der 20-OH Gruppe geschlussfolgert werden. Dies wurde auch durch die $^3J_{19\text{Ha},20\text{H}} = 11.0 \text{ Hz}$ (*anti*) und $^3J_{19\text{Hb},20\text{H}} = 1.5 \text{ Hz}$ (*gauche*) unterstützt. Zusammenfassend konnte die Konfiguration von Spirangien O (S11) von 20-OH als *R* anstatt *S*, wie in Spirangien A (S1) und B (S2), identifiziert werden.

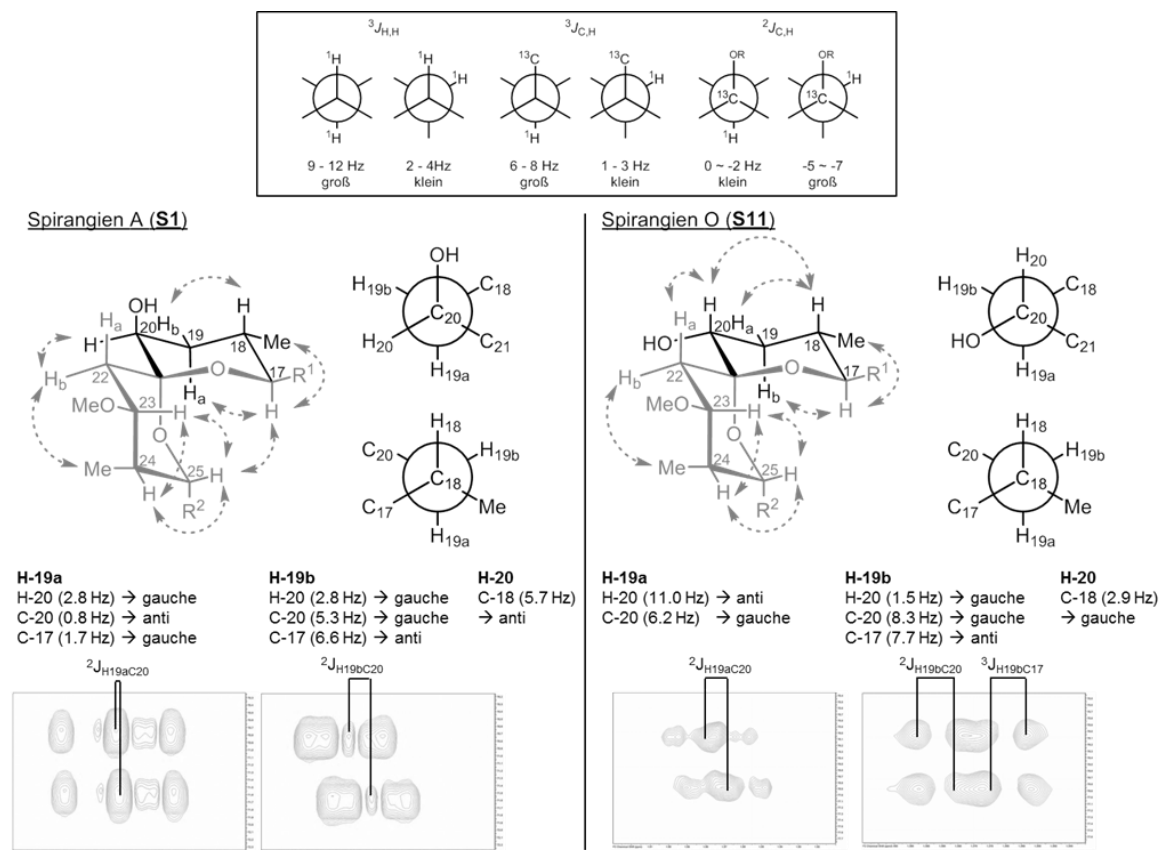


Abbildung 49: Konfiguration der Spiroketaeinheit von Spirangien A (S1) und Spirangien O (S11) basierend auf der Murata-Methode.

Basierend auf den $^3J_{H,H}$ - $^2J_{C,H}$ - und $^3J_{C,H}$ -Kopplungskonstanten und den ROESY-Daten konnten alle anderen Stereozentren als unverändert zu Spirangien A (S1) und B (S2) ermittelt werden. Auf Grund der identischen Signalverschiebungen und der Kopplungskonstanten der Protonensignale im 1H -NMR von Spirangien P (S12) im Vergleich zu Spirangien O (S11), konnte die Stereochemie von Spirangien P (S12) als gleich angesehen werden, mit dem Unterschied, dass es von Spirangien B (S2) abgeleitet ist (Abbildung 50).

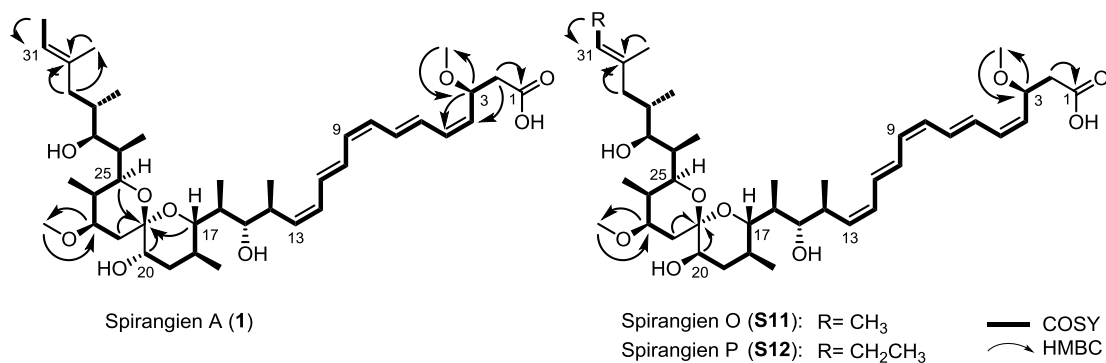


Abbildung 50: Strukturen der Spirangiene A (S1), O (S11) und P (S12).

Tabelle 14: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (S1), O (S11) und P (S12) (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz, in CD_3OD).

Verbindung	S1		S11		S12	
Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
17	75.3	3.59, dd (10.4, 0.8)	76.5	3.66, dd (9.6, 1.6)	76.5	3.66, dd (9.6, 1.6)
18	25.8	1.92, m	34.7	1.79, m	34.7	1.79, m
19	37.5	(a) 1.76, m (b) 1.67, dt (13.2, 3.6)	35.7	(a) 1.88, m (b) 1.37, ddd (14.0, 9.2, 1.5)	35.8	(a) 1.89, m (b) 1.38, m
20	71.2	3.39, t (2.8)	76.6	3.43, dd (11.0, 1.5)	76.6	3.44, dd (10.9, 1.6)
21	99.6	-	99.8	-	99.8	-
22	34.1	(a) 2.03, dd (13.1, 4.7) (b) 1.37, t (12.5)	31.2	(a) 1.79, m (b) 1.58, m	31.3	(a) 1.79, m (b) 1.59, m
23	78.9	3.64, m	78.9	3.73, dt (12.0, 4.7)	79.0	3.73, m
24	33.0	2.12, qdd (6.5, 4.3, 1.8)	33.2	2.15, qdd (6.9, 4.7, 1.8)	33.3	2.15, m
25	72.6	3.69, dd (10.3, 1.7)	72.9	3.82, dd (10.3, 1.8)	73.0	3.82, dd (10.3, 1.8)

4.3.7 Spirangien Q (S13)

Die Summenformel von Spirangien Q (**S13**), $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_9$, wurde über eine ESI-HRMS-Messung bestimmt ($[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 729.4895$). In Bezug auf den Pentaenrest waren die Signale der Protonen identisch zu denen von Spirangien A (**S1**). Die höhere molekulare Masse und das fehlende quartäre Kohlenstoffatom der Spiroketalereinheit ($\delta_{\text{C}21} = 99.6$ ppm) sowie der spezifischen ^1H , ^{13}C -HMBC-Kopplungen zu dem Kohlenstoff C-21 ließen auf eine azyklische Struktur von Spirangien A (**S1**) deuten. Die vorgeschlagene Struktur mit einer Hydroxylgruppe an C-17, C-21 und C-25 und einer CH_2 -Gruppe an C-20 ist in Abbildung 51 dargestellt. Über biosynthetische Überlegungen ließ sich diese Struktur als Vorstufe von zyklischen Spirangien formulieren.^[100] Die mit der Struktur übereinstimmenden Summenformel und die ^1H , ^1H -COSY- und ^1H , ^{13}C -HMBC-Korrelationen konnten die Vermutung bestätigen. Biosynthetisch konnten die Stereozentren vorausgesagt werden, mit Ausnahme der Hydroxylgruppe an C-21, da der Biosyntheseschritt der Zyklisierung noch nicht genau beschrieben ist. Das somit unbestimmte Stereozentrum an C-21 konnte über bioinformatische Analysen zur

Bestimmung der Konfiguration von sekundären Alkoholen^[165] ermittelt werden. Für diese Analyse wurde eine Weiterentwicklung einer Methode von MacDaniels^[166] und Caffrey^[167] genutzt. Sie basiert auf der Anwendung des Hidden Markov Modells (HMM) auf die Ketoreduktase-Domäne von sekundären Alkoholen. Die hier gesuchte Ketoreduktase-Domäne wurde als lokalisiert in spiG (Typ I modular PKS Modul 6) identifiziert. Die zugehörige Gensequenz konnte aus einer Online-Datenbank (clustermine360: A database of microbial PKS/NRPS biosynthesis) erhalten werden. Über eine Internetanwendung, die von Kitsche entwickelt wurde (<http://glimmer.rstudio.com/kitsche/profileHMM/>),^[168] wurde ein Ergebnis von 18.51 errechnet. Da dieser einen positiven Wert besitzt, wurde die D-Form des sekundären Alkohols vorhergesagt. Um eine weitere Bestätigung der Konfiguration an C-21 und auch der anderen Stereozentren zu erhalten, wurde ein HSQC-HECADE-NMR-Spektrum, basierend auf der Murata-Methode, aufgenommen. Die spezifischen Kopplungskonstanten stimmten mit den vermuteten Konfigurationen überein (Abbildung 51). Auch die Konfiguration an C-21 konnte dadurch bestätigt werden.

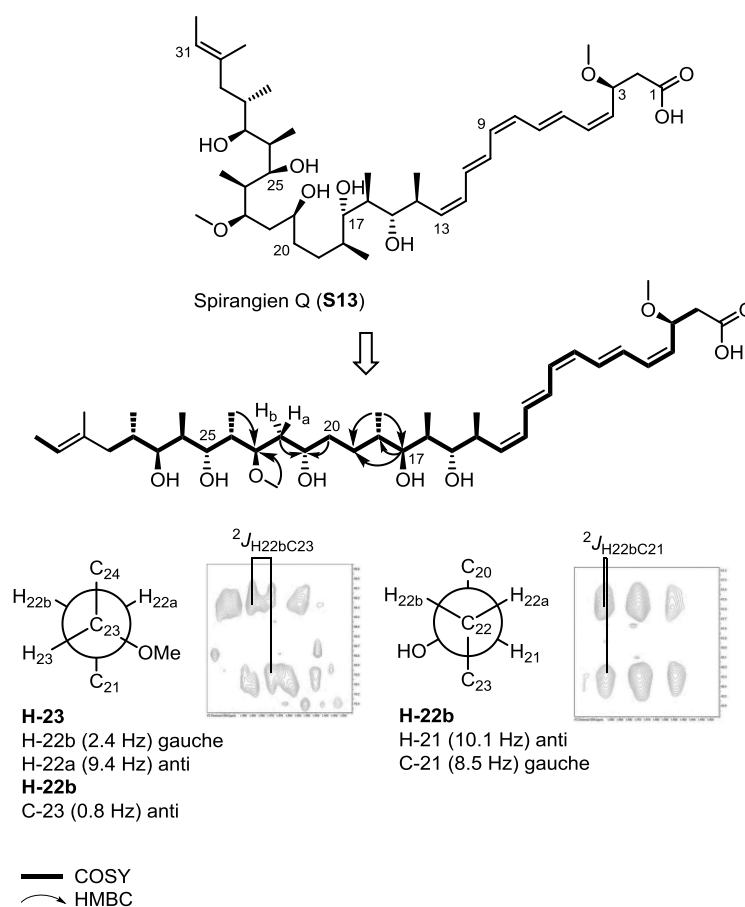


Abbildung 51: Konfigurationsbestimmung an C-21 von Spirangien Q (S13) basierend auf der Murata-Methode.

Neben den Kopplungskonstanten von $^3J_{23\text{H},22\text{Hb}} = 2.4 \text{ Hz}$ und $^3J_{23\text{H},22\text{Ha}} = 9.4 \text{ Hz}$, die zu einer *gauche*-Beziehung zwischen 22-H_b und 23-H und einer *anti*-Beziehung zwischen 22-H_a und 23-H führten, lag die $^2J_{\text{C}23,22\text{Hb}}$ Kopplungskonstante bei etwa 1 Hz und ließ auf eine *anti*-Beziehung schließen. Auf Grund der Kopplungskonstante von $^3J_{22\text{Hb},21\text{H}}$ von 10.1 Hz ist das Proton 21-H in *anti*-Stellung zu 22-H_b angeordnet. Dieses wurde durch die $^2J_{\text{C}21,22\text{Hb}}$ -Kopplungskonstante von 8.5 Hz bestätigt, die zu einer *gauche*-Beziehung zwischen 22-H_b und 21-OH führte. Die NMR-Daten von Spirangien Q (**S13**) im Vergleich zu Spirangien A (**S1**) sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Ausgewählte NMR-Daten von Spirangien A (S1) und Q (S13) (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz, in CD_3OD).

Verbindung	S1		S13	
Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]
17	75.3	3.59, dd (10.4, 0.8)	75.8	3.68, m
18	25.8	1.92, m	37.4	1.57, m
19	37.5	(a) 1.76, m (b) 1.67, dt (13.2, 3.6)	30.5	(a) 1.80, m (b) 1.34, m
20	71.2	3.39, t (2.8)	36.7	(a) 1.57, m (b) 1.37, m
21	99.6	-	69.7	3.72, m
22	34.1	(a) 2.03, dd (13.1, 4.7) (b) 1.37, t (12.5)	40.3	(a) 1.57, m (b) 1.48, m
23	78.9	3.64, m	81.9	3.57, ddd (9.4, 5.3, 2.4)
24	33.0	2.12, qdd (6.5, 4.3, 1.8)	39.0	1.94, m
25	72.6	3.69, dd (10.3, 1.7)	75.4	3.68, m

4.4 Biologische Aktivität

Für die Bestimmung der biologischen Aktivität der Spirangienderivate wurden Zytotoxizitätstests gegen L-929-Mausfibroblasten und KB-3-1-Zervixkarzinom-Zellen durchgeführt. Die Tests wurden dabei von den Abteilungen Mikrobielle Wirkstoffe und Chemische Biologie des HZI Braunschweigs ausgeführt. Außerdem wurden auch die isolierten Spirangiene A (**S1**) und B (**S2**) auf ihre Zytotoxizität hin untersucht und mit den Derivaten verglichen (Tabelle 16).

Tabelle 16: IC₅₀-Werte aus Zytotoxizitätstests der Spirangiene gegen L-929- und KB-3-1-Zellen.

Verbindung	IC ₅₀ [nM] ^[a]	
	L-929	KB-3-1
Spirangien A (S1)	0.114	0.1
Spirangien B (S2)	0.32	0.4
Spirangien G (S3)	22.3	4.5
Spirangien H (S4)	0.7	0.2
Spirangien I (S5)	2.4	1.7
Spirangien J (S6)	4.1	1.5
Spirangien K (S7)	1.0	1.1
Spirangien L (S8)	1.0	0.77
Spirangien M (S9)	3.1	3.1
Spirangien N (S10)	5.8	1.7
Spirangien O (S11)	8.8	6.8
Spirangien P (S12)	3.1	3.5
Spirangien Q (S13)	9.9	8.2

[a] Arithmetisches Mittel (Anzahl der Messungen: 2) Die IC₅₀-Werte wurden über einen MTT-Assay^[169] bestimmt.

Die Ergebnisse der Tests zeigten, dass alle Verbindungen stark zytotoxisch waren. Die Aktivitäten lagen im Bereich zwischen 0.11^[170] und 22.3 nM gegen die L-929-Zelllinie und zwischen 0.1 und 8.2 nM gegen die KB-3-1-Krebszelllinie. In Bezug auf die Unterschiede der Aktivität gegen die jeweiligen Zelllinien besaßen die meisten der Spirangiene die gleiche Zytotoxizität gegen die Zellen. Die Spirangiene H (**S4**), J (**S6**) und N (**S10**) zeigten eine dreifach höhere Aktivität gegen die KB-3-1-Zelllinie als gegen die L-929-Mausfibroblasten, und Spirangien G (**S3**) sogar eine fünffach höhere Aktivität. Spirangien A (**S1**) wirkte am stärksten zytotoxisch gegen die beiden Zelllinien, während Spirangien G (**S3**, 22.3 nM) am geringsten gegen L-929 und Spirangien Q (**S13**, 8.2 nM) am geringsten gegen KB-3-1 wirkte. In Bezug auf Struktur-Aktivitätsbeziehungen zeigten die zyklischen Spirangiene und die mit einer Methoxygruppe an C-23 eine höhere Bioaktivität gegen L-929- und KB-3-1-Zellen als das Derivat mit einer Hydroxylgruppe

an C-23 (Spi N, **S10**) (im Falle von L-929) und das azyklische Derivat (Spi Q, **S13**) eine geringere Aktivität. Auch eine Hydroxylgruppe an C-32 (Spi G, **S3**) und eine *R*-Konfiguration an C-23 (Spi O, **S11**) scheint einen Aktivitätsverlust zur Folge zu haben. Zwischen der Bioaktivität und der Kettenlänge an C-31 (CH_3 oder CH_2CH_3), der *E/Z*-Konfiguration oder der Methylierung an der 3-OH-Gruppe, ausgehend von den hier isolierten Spirangiederivaten, konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Des Weiteren wurden alle Spirangiene auch in Plattendiffusionstest gegen *B. subtilis*, *E. coli* K12 und *S. cerevisiae* getestet. Die Ergebnisse des Tests sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Ergebnisse der Plattendiffusionstests, Hemmhofdurchmesser in cm.

Verbindung	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> K12	<i>S. cerevisiae</i>
Spirangien A (S1)	2.2 ^[a]	-	1.8
Spirangien B (S2)	2.0 ^[a]	-	1.5 ^[a]
Spirangien G (S3)	-	-	-
Spirangien H (S4)	1.0 ^[a]	-	1.8
Spirangien I (S5)	1.5 ^[a]	-	1.6
Spirangien J (S6)	-	-	-
Spirangien K (S7)	-	-	-
Spirangien L (S8)	1.7 ^[a]	-	-
Spirangien M (S9)	-	-	-
Spirangien N (S10)	-	-	-
Spirangien O (S11)	-	-	-
Spirangien P (S12)	-	-	-
Spirangien Q (S13)	-	-	-

[a] Keine vollständige Lysis, aber sichtbare Hemmung des Wachstums.

Nur die Spirangiene A (**S1**), B (**S2**), H (**S4**), I (**S5**) und L (**S8**) zeigten eine Aktivität gegen *B. subtilis* und/ oder *S. cerevisiae*. Bei keinem der Derivate konnte eine Hemmung des *E. coli* K12-Wachstums beobachtet werden. Spirangien A (**S1**) ist gegen *B. subtilis*, einem gram-positiven Bakterium, und *S. cerevisiae*, einer Hefe, zusammen mit Spirangien H (**S4**) am aktivsten. Spirangien H (**S4**) und I (**S5**), die beide an C-3 eine Hydroxylgruppe statt einer Methoxygruppe tragen, zeigten Bioaktivität gegen *B. subtilis* und *S. cerevisiae*. Dass hingegen Spirangien J (**S6**), welches auch eine 3-OH-Gruppe besitzt, keine Hemmung des Wachstums des gram-positiven Bakteriums und der Hefe zeigt, könnte an der unterschiedlichen *E/Z*-Konfiguration liegen.

4.5 Biosynthese der Spirangiene

Die Polyketidbiosynthese von Myxobakterien, speziell von Spirangien A, wurde von B. Frank untersucht.^[171,172] Das vollständige Biosynthesegencluster besitzt eine Größe von 88.4 kb und besteht aus sieben kodierten Polyketidsynthasen (PKS), die insgesamt 16 Module enthalten (Abbildung 52). Spirangien A ist aus 16 Polyketideinheiten zusammengesetzt. Die Anzahl der Module sowie die Domänenorganisation folgen weitestgehend dem Kolinearitätsprinzip,^[173] mit Ausnahme des Lade- und Verlängerungsmoduls SpiD, in dem die Ketosynthase-(KS)-Domäne der Verlängerungseinheit zwischen der Acyl-Carrier-Protein-(ACP)-Domäne und der Acyltransferase-(AT)-Domäne des Lademoduls liegt. Es werden acht Malonat- und sieben Methylmalonat-Einheiten durch AT-Domänen eingebaut. Über die Abweichung von mehreren Resten der AT-Domäne des Lademodus selektiert sie Acetyl-CoA und Propionyl-CoA als Startereinheiten für die Spirangien A- bzw. Spirangien B-Biosynthese. Die Module 1, 11 und 13, deren Ketoreduktase-(KR)-Domänen einen Aspartat-Rest tragen (Typ B), führen die *E*-Doppelbindungen ein, während die Module 10 und 12 ohne Aspartat-Rest (Typ A) die *Z*-Doppelbindungen einführen.^[166,167] Die Thioesterase-Domäne (TE), die sich am Ende des letzten Moduls befindet, katalysiert die Abspaltung der fertig prozessierten Polyketidkette von der PKS als freie Säure.^[171] Im Anschluss an die PKS Biosynthese schließen sich post-PKS Reaktionen an, bei denen die Methoxygruppen an C-3 und C-23 und die Hydroxylgruppe an C-20 gebildet werden. Die Methyltransferase SpiK ist für Methylierung der Hydroxylgruppe an C-3 und die Methyltransferase SpiB für die Methylierung der Hydroxylgruppe an C-23 verantwortlich. Durch die Cytochrom P₄₅₀ Monooxygenasen SpiC und SpiL werden die Spiroketalfunktion und die Hydroxylgruppe an C-20 eingeführt.^[171] Welche Monooxygenase die Zyklisierung und welche die Hydroxylierung katalysiert, konnte noch nicht geklärt werden.



Bei der Untersuchung zur Biosynthese von Spirangien A wurden zwei mögliche Reaktionsfolgen zur Spiroketalbildung vorgeschlagen.^[172] In dem ersten Weg (Abbildung 53, Weg 1) wird zunächst die Hydroxylgruppe an Position C-21 zum Keton oxidiert, die Spiroketalfunktion gebildet und eine Hydroxylgruppe an C-20 eingeführt. Die Monooxygenase SpiL würde dabei die Oxidation an C-21 mit anschließender Zyklisierung und SpiC die Hydroxylierung an C-20 katalysieren. Der zweite hypothetische Weg verläuft zuerst über eine Hydroxylierung an C-20 mit daran folgenden Ringschließungen (Abbildung 53, Weg 2). Die Einführung der Hydroxylgruppe an C-20 würde die Monooxygenase SpiL und die Oxidations- und Zyklisierungsreaktionen SpiC katalysieren.

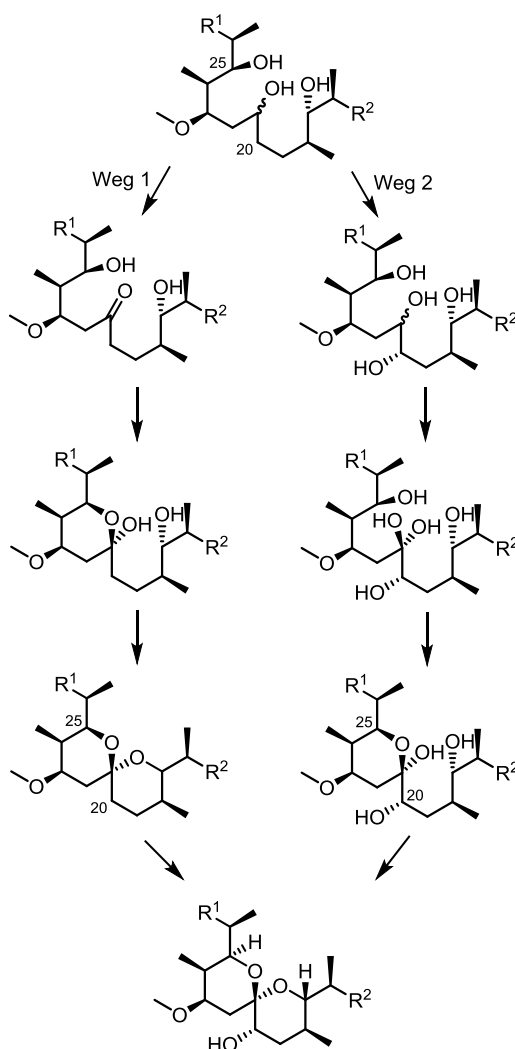
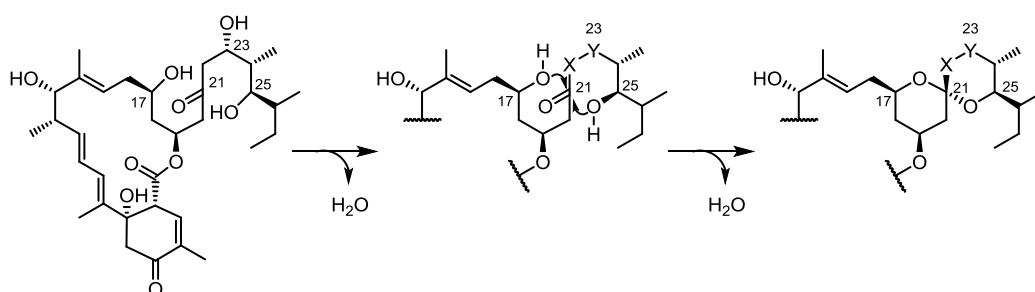


Abbildung 53: Mögliche Reaktionswege zur Spiroketalbildung in der Spirangienbiosynthese ausgehend von der azyklischen Vorstufe.

Es gibt nur wenige Beispiele, in denen die Biosynthese der Spiroketalbildung bekannt ist. Zwei Beispiele sind die Avermectin aus *Streptomyces avermitilis* und Monensin aus *Streptomyces cinnamonensis*. Bei der Biosynthese von Avermectin wird eine zentrale Carbonylgruppe nukleophil von zwei Hydroxylgruppen angegriffen, wodurch ein Hemiacetal entsteht, welches zur Acetalgruppe weiterreagiert (Abbildung 54).^[174,175] Bei Monensin greift eine Hydroxylgruppe nukleophil, durch zwei Epoxid-Hydrolasen enzymkatalysiert, ein Exopidkohlenstoffatom an, es bildet sich ein Acetal und es folgt eine Reihe von Ringöffnungen der Epoxide.^[176] In beiden Fällen handelt es sich bei dem zentralen Spiroketal Kohlenstoff zu Beginn um eine Ketogruppe.

Avermectin-Spiroketalbildung



X-Y = CH₂-CH(OH) oder CH=CH

Monensin-Spiroketalbildung

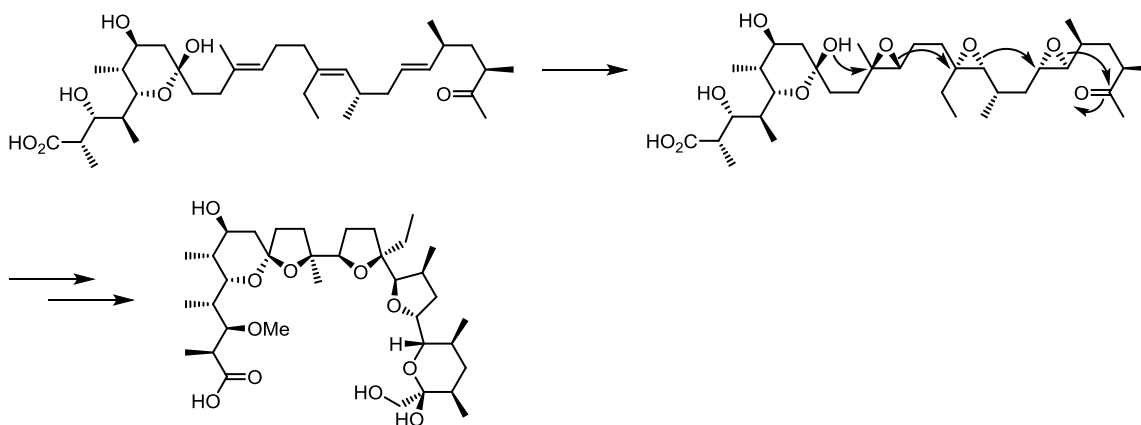


Abbildung 54: Vorgeschlagene Spiroketalbildung von Avermectin^[175] und Monensin.^[176]

Bei dem in dieser Arbeit isolierten Derivat Spirangien Q (**S13**) handelte es sich um die azyklische Vorstufe des Spiroketals (Abbildung 52, Struktur A). Spirangien H (**S4**), Spirangien I (**S5**), Spirangien N (**S10**) und Spirangien J (**S6**) sind biosynthetische Zwischenstufen der Bildung von Struktur C aus Struktur B (Abbildung 52), bei denen keine Methylierung an der Hydroxylgruppe an C-3 oder C-23 stattgefunden hat. Die Doppelbindungsisomere Spirangien J (**S6**), K (**S7**), L (**S8**) und M (**S9**) sind

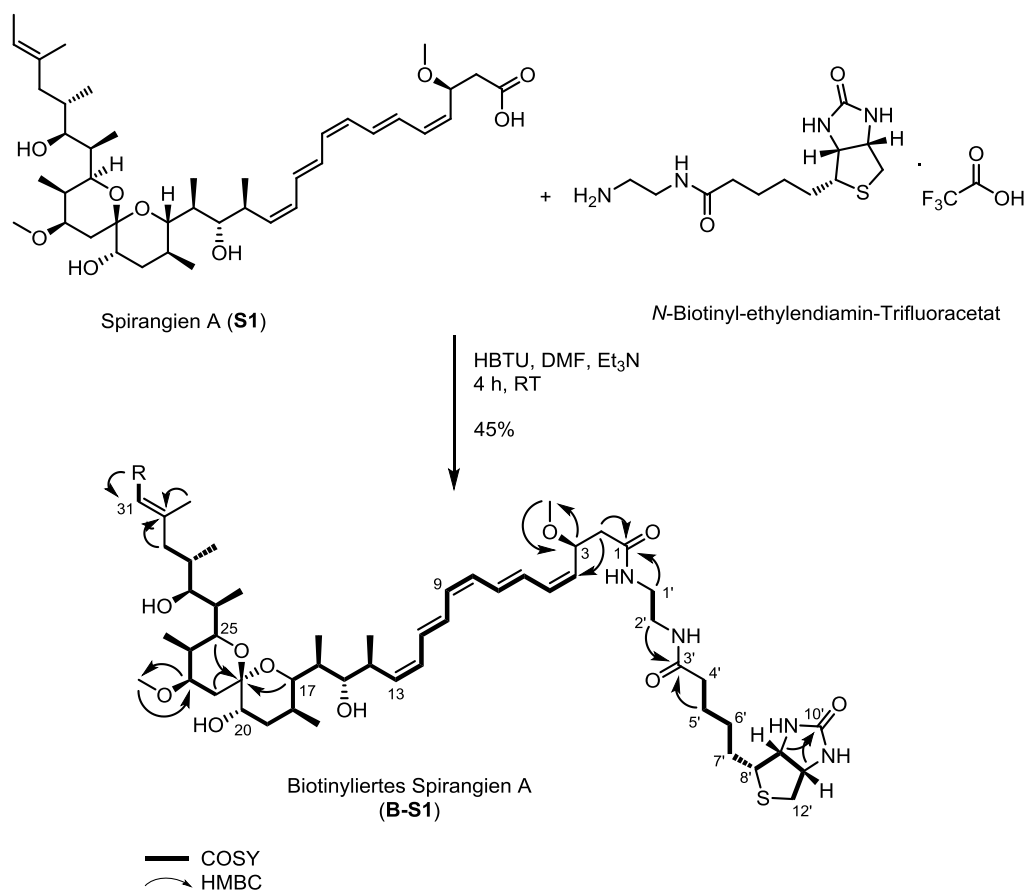
Isomerisierungsprodukte aus dem Isolierungsprozess oder sie wurden aus post-PKS-Reaktionen (durch Enzyme, Oxidierung, einer reaktiven Sauerstoffspezies) gebildet. Die Konfiguration von Spirangien O (**S11**) und Spirangien P (**S12**) an Position C-20 ist entgegengesetzt zu der von Spirangien A, da die Hydroxylgruppe nicht während der Polyketidbiosynthese gebildet wird, sondern durch eine Post-PKS-Oxidation während der Spiroketalbildung. Auch Spirangien G (**S3**), mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an C-32, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine Post-PKS-Oxidation entstanden.

4.6 Untersuchungen zum Target von Spirangien A

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus sollten Studien zum Wirkort in der Zelle und zum Target von Spirangien A (**S1**) durchgeführt werden. Dazu wurden verschiedene biochemische Methoden angewendet. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik wurden Lokalisierungsstudien und mit einem Pulldown-Assay das „Target-Fishing“ durchgeführt.

4.6.1 Darstellung des biotinylierten Spirangien A (**B-S1**)

Um das Target von Spirangien A (**S1**) zu untersuchen, wurde ein Pulldown-Assay mit magnetischen Beads durchgeführt. Dafür musste eine Biotingruppe in das Molekül eingebaut werden. Da durch vorangegangene Aktivitätsstudien^[95] die Doppelbindungskette mit Methoxy- und endständiger Carboxylgruppe als für die Bioaktivität verantwortliche Struktureinheit ausgeschlossen werden konnte, konnte die Carboxylgruppe für die Modifizierung verwendet werden. Unter einer Kupplungsreaktion von Spirangien A (**S1**) mit *N*-Biotinyl-ethylendiamin-Trifluoracetat und HBTU als Aktivator in DMF wurde eine Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe von Spirangien A (**S1**) und dem endständigen Amin der Biotinverbindung gebildet. Das biotinylierte Spirangien A (**B-S1**) konnte in 45% Ausbeute (4.1 mg) erhalten werden (Abbildung 55).

Abbildung 55: Darstellung des biotinylierten Spirangien A (**B-S1**).

Die ¹H-NMR-Spektren von Spirangien A (**S1**) und der biotinylierten Verbindung (**B-S1**) sind vergleichend in Abbildung 56 untereinander dargestellt. Das erhaltene Molekulargewicht von [M+Na]⁺ $m/z = 993.6325$ mittels einer hochauflösenden ESI-MS-Messung stimmte mit der gewünschten Struktur überein und ergab eine Summenformel von C₅₄H₉₀N₄O₉S. Die charakteristischen Signale der Biotinylethylendiamin-Einheit des biotinylierten Spirangien A (**B-S1**) im ¹H-NMR-Spektrum waren zum einen die Signale 9'-H bei $\delta_H = 4.30$ ppm und 11'-H bei $\delta_H = 4.49$ ppm und zum anderen die 12'-H Signale bei $\delta_{Ha} = 2.92$ ppm und $\delta_{Hb} = 2.70$ ppm und das 4'-H Signal bei $\delta_H = 2.20$ ppm (Abbildung 56).

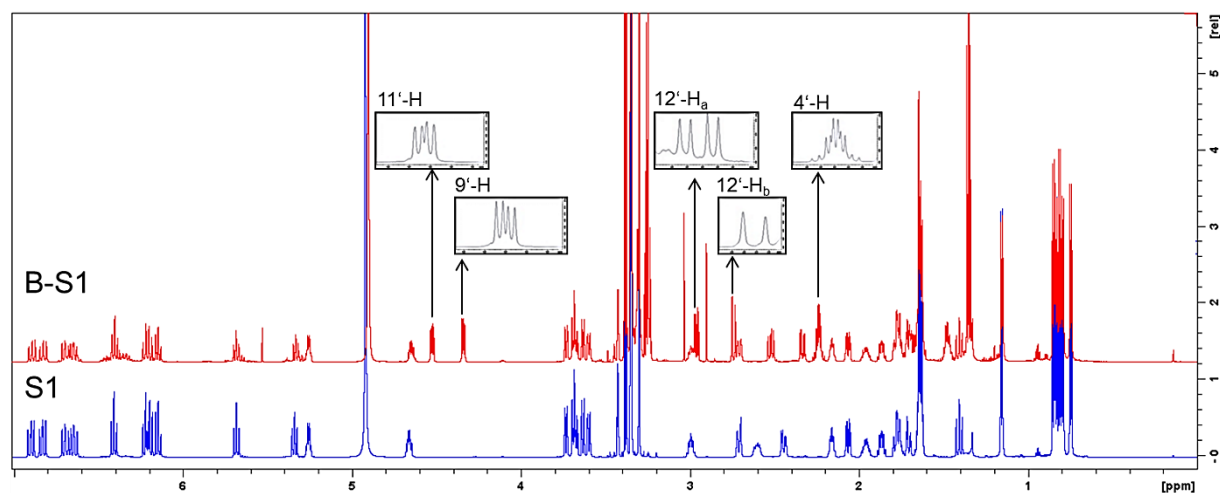


Abbildung 56: ^1H -NMR von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**, 500 MHz, in CD_3OD) und Spirangien A (**S1**, 700 MHz, in CD_3OD).

Die ^1H , ^{13}C -HMBC-Kopplungen von $1'\text{-H}$ zu C-1 und von $2'\text{-H}$ und $5'\text{-H}$ zu C-3' und die ^1H , ^1H -COSY-Kopplungen konnten die Struktur bestätigen (Tabelle 18). Die restlichen ^1H -NMR-Signale des biotinylierten Spirangien A (**B-S1**) waren identisch mit denen von Spirangien A (**S1**) und wurden an dieser Stelle nicht aufgeführt. Die kompletten spektroskopischen Daten befinden sich im Abschnitt 6.2.5.

Tabelle 18: Ausgewählte NMR-Daten von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) (^1H : 500 MHz, in CD_3OD).

Atom	δ_{C} [ppm] ^[a]	δ_{H} [ppm], Multiplizität [J in Hz]	COSY	HMBC
$1'$	40.0	3.27, m	$2'$	$1, 2'$
$2'$	40.0	3.27, m	$1'$	$1', 3'$
$3'$	176.0	-		
$4'$	36.6	2.20, td (7.4, 2.2)	$5'$	$3', 5'$
$5'$	26.7	1.65, m	$4', 6'$	$3', 4'$
$6'$	26.9	1.44, m	$5', 7'$	$5', 8'$
$7'$	29.4	(a) 1.74, m (b) 1.60, m	$6', 7'b, 8'$ $6', 7'a, 8'$	$8'$
$8'$	56.9	3.21, m	$7', 9'$	$7'$
$9'$	63.2	4.30, dd (7.9, 4.4)	$8', 11'$	$8', 10', 12'$
$10'$	165.7	-		
$11'$	61.5	4.49, ddd (7.9, 5.0, 0.8)	$9', 12'$	$8', 10', 12'$
$12'$	40.9	(a) 2.92, dd (12.7, 5.0) (b) 2.70, d (12.7)	$11', 12'b$ $11', 12'a$	$8', 9', 11'$ $8', 9', 11'$

[a] Daten aus ^1H , ^{13}C -HSQC- und ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR.

Um einzuschätzen, ob die Biotinylierung Auswirkungen auf die Aktivität hatte, wurden beide Substanzen gegen sieben verschiedene Zelllinien in einem IC_{50} -Assay getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: IC₅₀-Werte von Spirangien A (S1) und biotinyliertem Spirangien A (B-S1) gegen sieben Zelllinien.

Zelllinie	S1	B-S1
	IC ₅₀ [ng mL ⁻¹]	
L-929	0.08	13.0
KB-3-1	0.068	5.0
SK-OV-3	0.095	5.5
PC-3	0.14	6.0
MCF-7	0.038	4.5
A549	0.035	1.6
HUVEC	0.038	2.9

Die IC₅₀-Werte wurden über einen MTT-Assay^[169] bestimmt.

Die Aktivität vom biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) war im Vergleich zu Spirangien A (**S1**) um den Faktor 50 bis 100 gesunken. Die IC₅₀-Werte lagen jedoch noch im ng mL⁻¹-Bereich, was einer sehr hohen Aktivität entsprach, sodass mit dem biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) an der Targetsuche gearbeitet werden konnte.

4.6.2 Pulldown-Assay

In dem Modell des Pulldown-Assays bildete die Ethyldiamineinheit des biotinylierten Spirangien A (**B-S1**) den „Linker“ und das Biotin den „Funktionellen Tag“ (Abbildung 57).

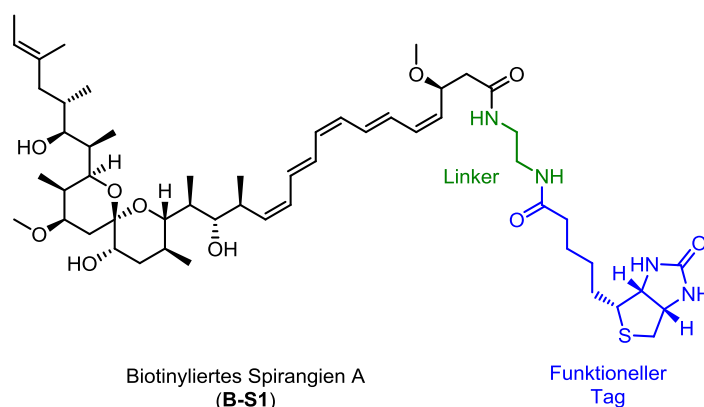


Abbildung 57: Biotinyliertes Spirangien A (B-S1) für den Pulldown-Assay.

Zur Immobilisierung wurden Dynabeads[®] Streptavidin von Invitrogen verwendet. Die Beads sind superparamagnetische Polymerpartikel mit einer einheitlichen Größe und einer gleichmäßigen, definierten Oberfläche, die kovalent gebundene Streptavidinmoleküle trägt. Es wurden vier Sorten von Beads mit unterschiedlicher Größe und Polarität der Oberfläche verwendet. Über die sehr hohe Affinität von Streptavidin

und Biotin ($K_a = 10^{14}$ - 10^{15} M^{-1}) konnte das mit Biotin modifizierte Spirangien A (**B-S1**) an den Beads immobilisiert werden, um so das Targetfishing zu ermöglichen. Mit Hilfe eines Magnetständers konnten während des Waschvorgangs wiederum die Beads, die sich im Reaktionsgefäß befanden, am Rand des Gefäßes immobilisiert werden.

Zunächst wurden KB-3-1-Zellen lysiert hergestellt und mit biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) behandelt. Eine Zelllysatsprobe wurde mit Spirangien A (**S1**) als Negativkontrolle behandelt und eine Lysatprobe mit Methanol. Für die Erfassung von kompetitiven Bindungen wurde in einem weiteren Parallelversuch das Lysat für eine Stunde mit biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) und anschließend mit Spirangien A (**S1**) inkubiert. Nach der Inkubation der einzelnen Lysate wurden diese mit Dynabeads® inkubiert (Abbildung 58). Die Beads wurden anschließend gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen und mit 3X SDS denaturierendem Loading dye bei 96 °C für 10 Minuten erhitzt. Die Proteine wurden mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung angefärbt. Mit Hilfe einer MALDI-MS-Messung und anschließendem Vergleich mit einer Datenbank wurden mögliche Proteine als Target identifiziert.

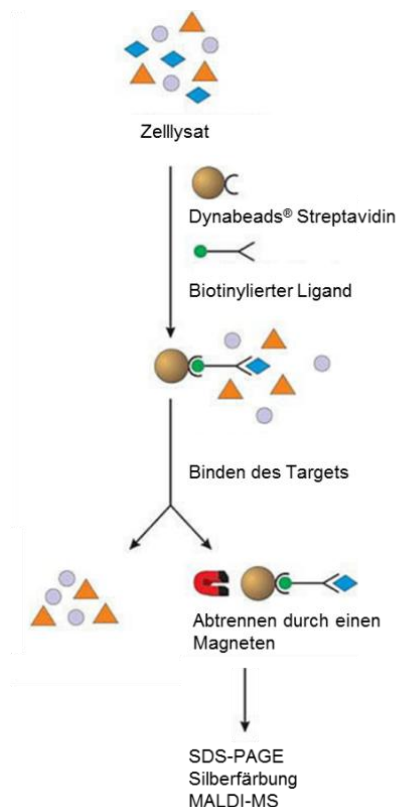


Abbildung 58: Pulldown-Experiment unter Verwendung von Dynabeads® Streptavidin.^[177]

Unter Verwendung von vier verschiedenen Dynabeads® (M-280, M-270, MyOne C1, MyOne T1) konnten jeweils identische Ergebnisse mit M-280 und M-270 sowie MyOne C1 und MyOne T1 erhalten werden. Bei den Beads M-280 und M-270 handelte es um Beads mit einer hydrophoben Oberfläche, während MyOne C1 und MyOne T1 eine hydrophile Oberfläche besaßen. In Abbildung 59 sind beispielhaft die Ergebnisse der Experimente mit M-280- und MyOne C1-Beads dargestellt.

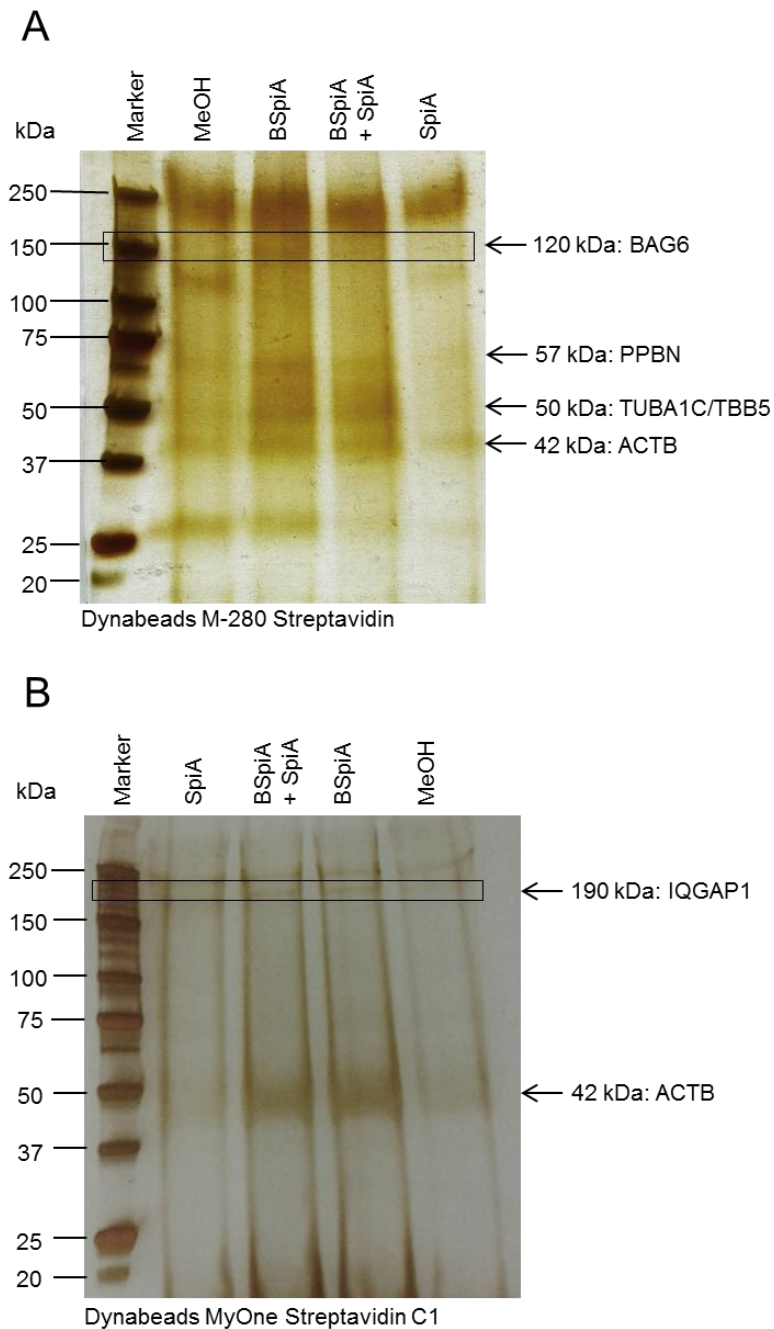


Abbildung 59: Pulldown-Assay mit (A) Dynabeads M-280 und (B) Dynabeads MyOne C1.

Mit hydrophoben Beads ergaben sich nach der MALDI-MS-Messung das Chaperonregulatorprotein BAG6 mit einer Masse von 120 kDa sowie die alkalische Phosphatase PPBN (57 kDa), Tubuline (TUBA1C, TBB, 50 kDa) und zytoplasmatisches Aktin ACTB mit einer Masse von 42 kDa (Abbildung 59, A). Phosphatasen, Tubulin und Aktin kommen ubiquitär in der Zelle vor. Bei Chaperonregulatoren handelt es sich um Proteine, welche die Funktionsfähigkeit anderer Proteine unterstützen. Sie helfen bei der Faltung entstehender Polypeptide, verhindern Aggregationen und entfernen stressinduzierte Fehlfaltungen.^[178]

Bei der Verwendung von hydrophilen Beads konnte das Ras GTPase-aktivierende Protein IQGAP1 (190 kDa) und Aktin ACTB mit einer Masse von 42 kDa identifiziert werden (Abbildung 59, B). Das Protein IQGAP1 ist ein zentraler Vermittler von mehreren unterschiedlichen zellulären Prozessen, insbesondere bei der Neuordnung des Zytoskeletts. In neuesten Untersuchungen konnte eine potentielle Rolle von IQGAP1 in Krebserkrankungen festgestellt werden. Die Überexpression und bestimmte Lokalisierung in der Membran konnte in Zusammenhang mit dem Auftauchen von Krebserkrankungen gebracht werden.^[179]

Bei der Analyse durch die MALDI-MS-Messung wurde zu jedem identifizierten Protein auch ein sogenannter Score ermittelt, bei dem die erhaltenen Daten mit Literaturdaten verglichen werden und der Score die Übereinstimmung der Daten wiedergibt. Liegt der Score über der Grenze von 67, dann handelt es sich um ein signifikantes Ergebnis. Der Score von BAG6 lag bei 58, während IQGAP1 einen sehr hohen Score von 197 besaß. Auf Grund des Scores und des potentiellen Zusammenhangs in der Krebsbildung lag der Fokus in der weiteren Untersuchung zum Target auf dem Protein IQGAP1. Weiterführende Untersuchungen mit einem Western Blot unter Verwendung eines IQGAP-Antikörpers konnten keinen weiteren Aufschluss bzw. Bestätigung von IQGAP1 als Target liefern.

4.6.3 Lokalisierungsstudien

Zur Untersuchung der Lokalisierung in der Zelle wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz Lokalisierungsstudien durchgeführt. Dazu wurden drei verschiedene Zelllinien (L-929, KB-3-1 und A549) auf Deckgläschen in einer 24-Well-Platte kultiviert und für 20 Stunden mit biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) in drei verschiedenen Konzentrationen bei 37 °C inkubiert (Abbildung 60). Die Konzentrationen des

biotinylierten Spirangien A (**B-S1**) entsprachen den zuvor bestimmten IC_{30} -, IC_{50} - und IC_{90} -Werten, die aus die Zytotoxizitätstest auf die jeweiligen Zelllinien erhalten wurden.

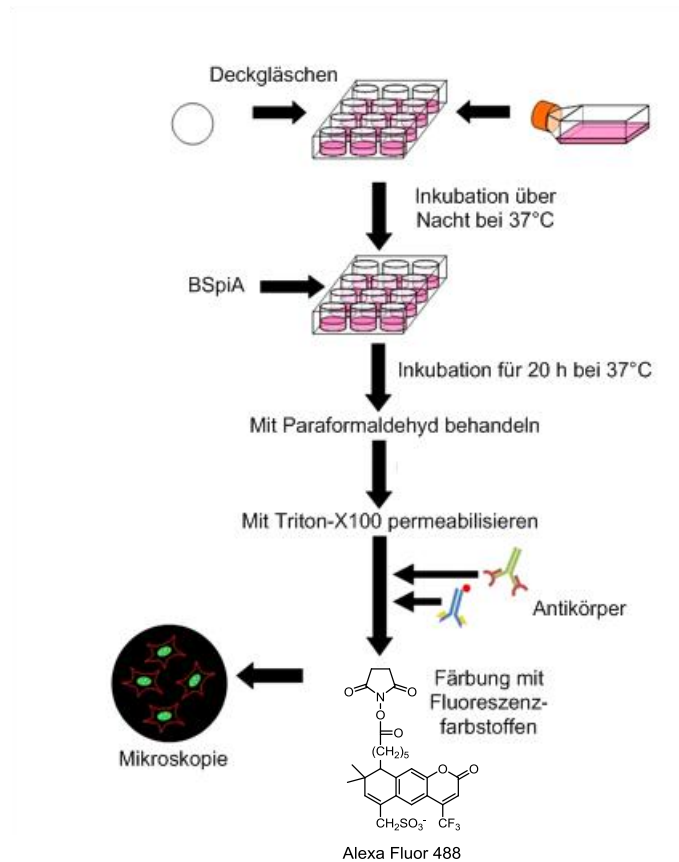


Abbildung 60: Immunfluoreszenz-Experiment.

Mit Methanol inkubierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit verschiedenen Methoden fixiert und anschließend mit Triton-X100 permeabilisiert. Das biotinylierte Spirangien A (**B-S1**) wurde mit zwei unterschiedlichen Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen (Streptavidin-FITC, Streptavidin-Alexa 488) angefärbt, während Aktin und Tubulin mit Alexa 594 (rot) und die Zellkerne mit DAPI gefärbt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

In Abbildung 61 wurden die A549-Zellen mit biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) für 20 Stunden inkubiert und mit 70% Methanol/ 30% Aceton fixiert. Das Experiment mit der Konzentration an biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) von 4.1 ng mL^{-1} , die dem IC_{90} -Wert für die Zelllinie entsprach, brachte die besten Ergebnisse nach der Fluoreszenzmessung im Vergleich zu den geringeren eingesetzten Konzentrationen (entsprechend der IC_{30} - und der IC_{50} -Werte). Die Inkubation mit Methanol diente als

Kontrollexperiment. Die Anfärbung des biotinylierten Spirangien A (**B-S1**) erfolgte mit Streptavidin-FITC (grün). Tubulin ist rot und die Kerne blau gefärbt.

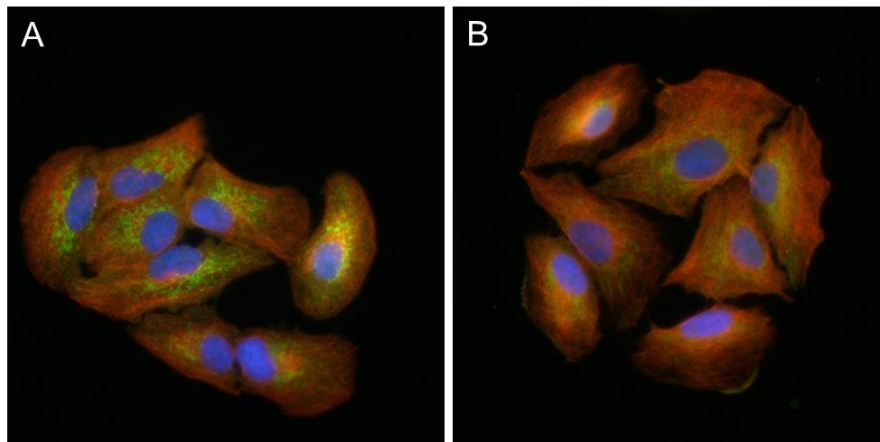


Abbildung 61: Immunfluoreszenz von A549-Zellen, Streptavidin-FITC (grün), Tubulin (rot), Zellkerne (blau), (A) **B-S1**, 4.1 ng mL^{-1} , IC_{90} , (B) Methanolkontrolle.

In der Methanolkontrolle (Abbildung 61, B) kann man eine Hintergrundfluoreszenz (grün) erkennen. Dabei handelte es sich um Biotin in den Mitochondrien, welches dort als Koenzym bei Carboxylierungsreaktionen fungiert. Mit biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) war eine erhöhte Grünfärbung in den Zellen zu beobachten. Dies deutete auf eine scheinbare Lokalisierung von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) im Zytoplasma und nicht im Zellkern oder der Zellmembran hin. Es konnte keine genauere Lokalisierung festgestellt werden. In weiteren Versuchen wurden die zwei Fluoreszenzfarbstoffe Streptavidin-Alexa 594 und Streptavidin-Texas Red zur Färbung von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) verwendet. Es handelt sich dabei um rote Farbstoffe. Aktin und Tubulin wurden mit Alexa 488 (grün) und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (Abbildung 62). Die Fixierung erfolgte durch 4% Paraformaldehyd.

Es konnte weder ein Unterschied zwischen den mit biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) behandelten Zellen (Abbildung 62, A) und der entsprechenden Methanolkontrolle (Abbildung 62, B) bei der Färbung mit Streptavidin-Texas Red als auch bei der Färbung mit Alexa 594 beobachtet werden (Abbildung 62, C: **B-S1**, D: Methanolkontrolle). Bei den Fluoreszenzfärbungen in der Methanolprobe handelte es sich wiederum um, in Mitochondrien enthaltene, Biotine. Weiterführende Experimente zur Lokalisierung von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) sind notwendig.

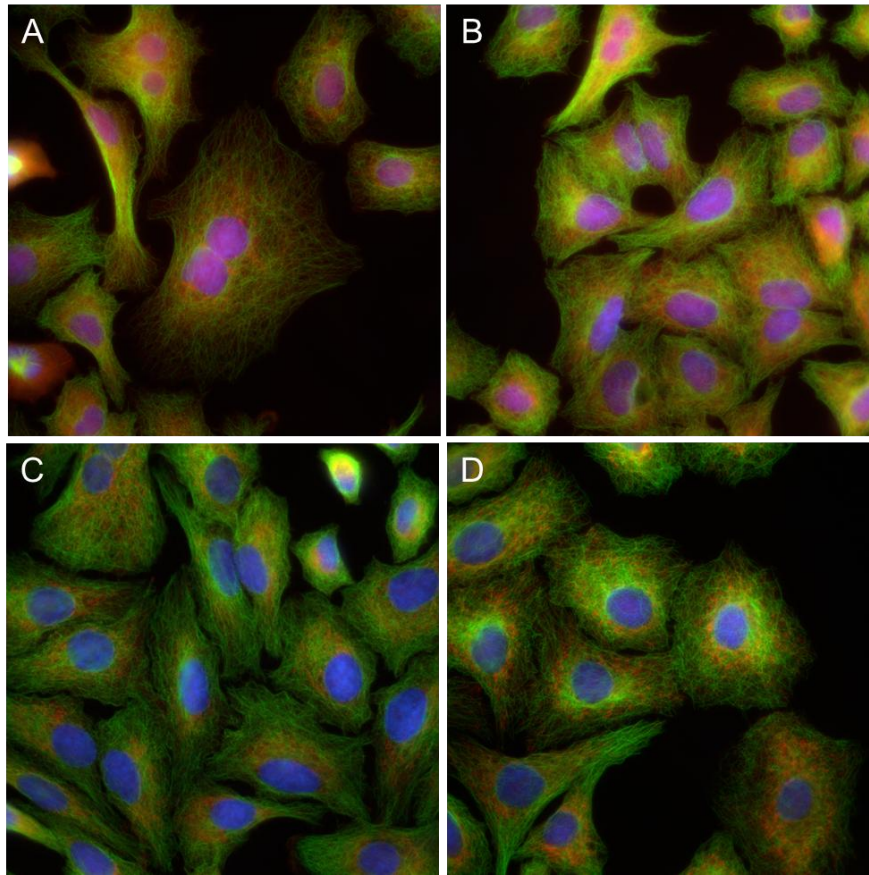
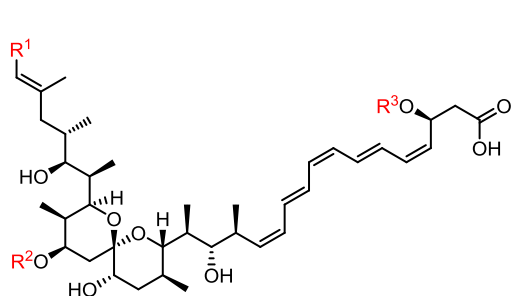


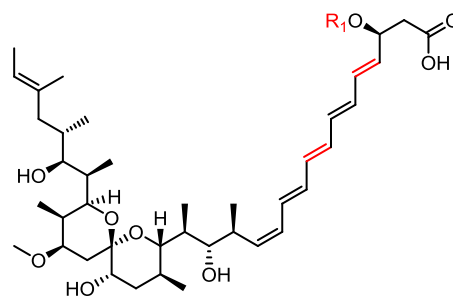
Abbildung 62: Immunfluoreszenz von A549-Zellen, Tubulin (grün), Zellkerne (blau), (A) B-S1, 1.6 ng mL^{-1} , IC_{50} , Anfärbung mit Streptavidin-Texas Red (rot), (B) Methanolkontrolle, Anfärben mit Streptavidin-Alexa 594 (rot), (C) B-S1, 1.6 ng mL^{-1} , IC_{50} , Anfärbung mit Streptavidin-Alexa 594 (rot), (D) Methanolkontrolle, Anfärbung mit Streptavidin-Alexa 594 (rot).

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

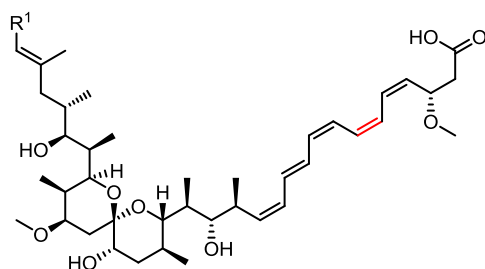
Es konnten Spirangien A (**S1**) und B (**S2**) sowie elf Spirangienderivate (**S3** bis **S13**) aus einer 12 L- und einer 70 L-Fermentation des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* (So ce90) isoliert und die Struktur sowie die genaue Konfiguration bestimmt werden (Abbildung 63).



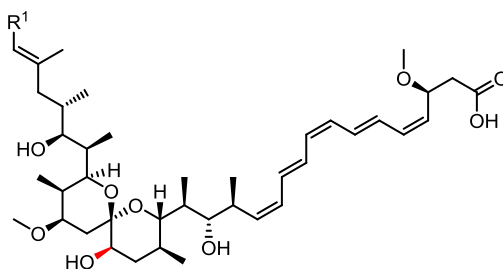
Spirangien A (**S1**): $R^1 = \text{CH}_3$ $R^2 = \text{CH}_3$ $R^3 = \text{CH}_3$
 Spirangien B (**S2**): $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $R^2 = \text{CH}_3$ $R^3 = \text{CH}_3$
 Spirangien G (**S3**): $R^1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R^2 = \text{CH}_3$ $R^3 = \text{CH}_3$
 Spirangien H (**S4**): $R^1 = \text{CH}_3$ $R^2 = \text{CH}_3$ $R^3 = \text{H}$
 Spirangien I (**S5**): $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $R^2 = \text{CH}_3$ $R^3 = \text{H}$
 Spirangien N (**S10**): $R^1 = \text{CH}_3$ $R^2 = \text{H}$ $R^3 = \text{CH}_3$



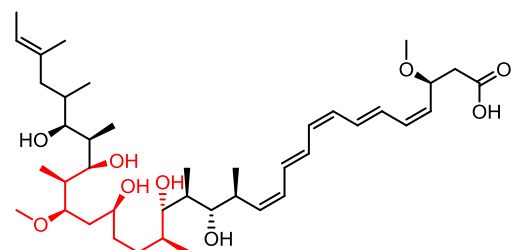
Spirangien J (**S6**): $R^1 = \text{H}$
 Spirangien K (**S7**): $R^1 = \text{CH}_3$



Spirangien L (**S8**): $R^1 = \text{CH}_3$
 Spirangien M (**S9**): $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$



Spirangien O (**S11**): $R^1 = \text{CH}_3$
 Spirangien P (**S12**): $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$



Spirangien Q (**S13**)

Abbildung 63: Isolierte Spirangienderivate. Die modifizierte Teile der Struktur im Vergleich zu Spirangien A (S1**) und B (**S2**) sind hervorgehoben.**

Die Strukturaufklärung erfolgte dabei mit Hilfe von 1D-NMR-Spektren, verschiedenen 2D-NMR-Spektren und der Massenspektrometrie. Über den Vergleich der ^1H -NMR-Spektren mit dem des Spirangien A (**S1**), dessen Stereochemie bekannt ist, konnten die Derivate mit gleicher Stereochemie identifiziert werden. Die Derivate mit anderer Stereochemie wurden mit Hilfe von ROESY-Experimenten, der Murata-Methode,^[103,106] biosynthetischen Analysen und statistischen Analysen des PKS-Genclusters aufgeklärt. Die Derivate, die sich in der *E/Z*-Isomerie unterschieden und nicht über die Kopplungskonstanten im ^1H -NMR bestimmt werden konnten, wurden über die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren auf einem 900 MHz-Gerät aufgeklärt. Vier Derivate (Spirangiene J-M, **S6** bis **S9**) unterschieden sich von Spirangien A (**S1**) und B (**S2**) in der *E/Z*-Isomerie der konjugierten Doppelbindungskette, vier (Spirangiene H-J (**S4** bis **S6**) und N (**S10**)) zeichneten sich durch eine fehlende Methylierung an der Methoxygruppe an Position C-3 oder C-23 aus und zwei Spirangiene (O (**S11**) und P (**S12**)) besaßen eine entgegengesetzte Konfiguration an der C-20 Position im Vergleich zu den bekannten Spirangien A (**S1**) und B (**S2**). Spirangien Q (**S13**) wies kein Spiroketalgrundgerüst auf, was auf die Reduktion der Carbonylgruppe an C-21 zurückzuführen war und Spirangien G (**S3**) zeichnete sich durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe an C-32 aus. Die Desmethylderivate Spirangien H (**S4**), I (**S5**) und N (**S10**) und das azyklische Spirangien Q (**S13**) wurden auch schon von B. Frank isoliert, jedoch war dort die Stereochemie unbekannt.^[172] Alle weiteren Spirangienderivate waren nicht literaturbekannt. Die Spirangiene zeigten in Zytotoxizitätstest gegen L-929- und KB-3-1-Zelllinien sehr hohe Aktivitäten. Auch wenn die biologischen Aktivitäten der Derivate nicht das Level von Spirangien A (**S1**) erreichten, lagen die Aktivitäten trotzdem im geringen nanomolaren Bereich, was die meisten anderen zytotoxischen Verbindungen bei weitem übertrifft.^[1,180] Wichtig zu erwähnen war außerdem, dass vier der Derivate eine spezifische Aktivität gegenüber Tumorzellen zeigten, was für Spirangien A (**S1**) und B (**S2**), die kaum einen Unterschied in deren zytotoxischem Verhalten zwischen Tumorzellen und nicht-transformierten Zellen zeigen, nicht beobachtet werden konnte. In Plattendiffusionstests zeigten die Spirangiene A (**S1**), B (**S2**), H (**S4**), I (**S5**) und L (**S8**) eine Hemmung des Wachstums vom gram-positiven Bakterium *B. subtilis* und/ oder der Hefe *S. cerevisiae*. Des Weiteren war die Strukturaufklärung von Spirangien Q (**S13**) ein Beispiel, in der die Konfiguration über eine statistische Analyse des PKS-Genclusters bestimmt werden konnte.

Das durch ein Pulldown-Assay „gefischte“ mögliche Target IQGAP1 von Spirangien A (**S1**) konnte durch einen Nachweis mit einem entsprechenden Antikörper nicht bestätigt werden. Es könnte auch weitere Targets geben, dessen Bindung zum biotinylierten Spirangien A (**B-S1**) aber zu gering ist und beim Waschvorgang abgewaschen wurden. Mit Hilfe von Lokalisierungsstudien konnte ein Hinweis auf die Lokalisierung von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) im Zytoplasma der Zelle gewonnen werden. Die Färbung mit weiteren Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen brachte keine Bestätigung dieser Vermutung. Um weitere Erkenntnisse gewinnen zu können, sind weitere Experimente notwendig.

Die in der Literatur angewendeten Beispiele zur Immunfluoreszenz beruhen auf der Inkubation der Zellen mit einem nicht-chemisch modifizierten Inhibitor. Da das biotinylierte Spirangien A (**B-S1**) auf Grund des zuvor durchgeführten Pulldown-Assays vorhanden war und sich die Biotineinheit hervorragend für die Kopplung mit Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen eignete, wurde dieses anstelle vom unmodifizierten Spirangien A (**S1**) eingesetzt. In den Experimenten wurde nach den Protokollen für eine nicht-modifizierte Struktur gearbeitet. In einer Veröffentlichung von Garcia *et al.*, in der ebenfalls eine biotinylierte Struktur eingesetzt wurde, wurde zunächst die biotinylierte Substanz mit Streptavidin-FITC inkubiert und erst nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit diesen inkubiert.^[181] Diese Vorgehensweise könnte auch in diesem Fall hilfreich sein. Von Garcia *et al.* wurde dabei eine Konzentration von 10 nM biotinylierter Substanz eingesetzt. Da nur noch ein wenig einer 1 mM-Lösung von biotinyliertem Spirangien A (**B-S1**) zur Verfügung stand, müsste zur Durchführung dieser Reaktion neues biotinyliertes Spirangien A (**B-S1**) hergestellt werden oder mit einer etwas weniger konzentrierten Lösung in einem Testexperiment gearbeitet werden.

Weiterführend zur Methode des Pulldown-Assays könnte auch eine weitere Methode, die Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS)-Methode angewendet werden (Abbildung 64).

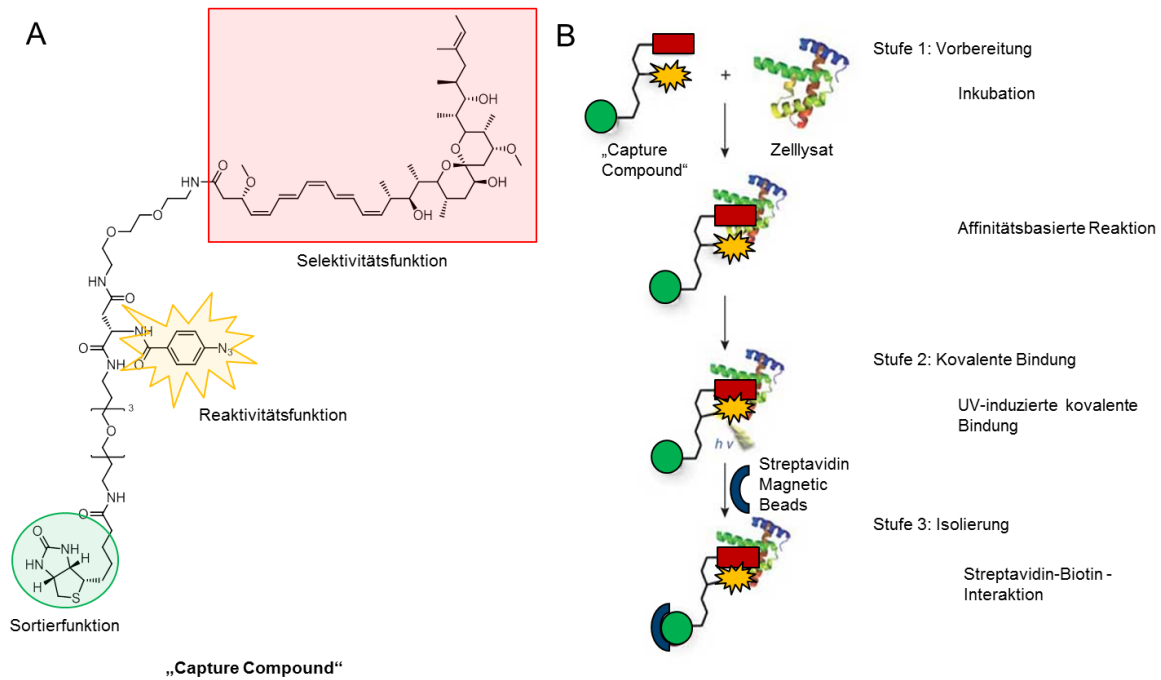


Abbildung 64: Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS), (A) Capture Compound ausgehend von Spirangien A, (B) CCMS-Experiment.^[182]

Sogenannte „Capture Compounds“ sind trifunktionale Moleküle, die neben dem zum Targetfishing enthaltenen Naturstoff (Selektivitätsfunktion) und den magnetischen Beads (Sortierfunktion) noch eine zusätzliche Reaktionsfunktion besitzen. Diese verhilft zur Ausbildung einer kovalenten Bindung innerhalb des aktiven Zentrums des Zielproteins.^[123] Dadurch können auch schwach bindende Zielproteine der Analyse zugänglich gemacht werden. Um sterische Wechselwirkungen der Reaktivitätsfunktion mit der Selektivitätsfunktion, die zur Hinderung einer Ligand-Protein-Wechselwirkung führen könnte, zu vermeiden, ist die Reaktivitätsfunktion unabhängig zu der Selektivitätsfunktion.^[183] Nach der Inkubation des Zelllysats mit dem „Capture Compound“ (Abbildung 64, B, Stufe 1) wird das Gleichgewicht mit Hilfe der Reaktionsfunktion, einer photolabilen Gruppe, „eingefroren“. Dazu wird mittels UV-Licht die photolabile Gruppe aktiviert, die sofort mit dem Zielprotein, das in unmittelbarer Nähe liegt, reagiert (Abbildung 64, B, Stufe 2). Durch die Zugabe von Streptavidin-gekoppelten magnetischen Beads wird der Capture Compound-Zielprotein-Komplex aus der Probe entfernt (Abbildung 64, B, Stufe 3). Anschließend kann eine SDS-PAGE-Aufreinigung und Analyse mittels Massenspektrometrie erfolgen.

Eine alternative Methode wäre die Strategie der Isotopenmarkierung von Aminosäuren. Bei SILAC (Stable Isotope Labelling of Amino Acids In Cell Culture)^[184] werden Peptide oder Proteine entweder mit leichten oder mit schweren Isotopen markiert (Abbildung 65).

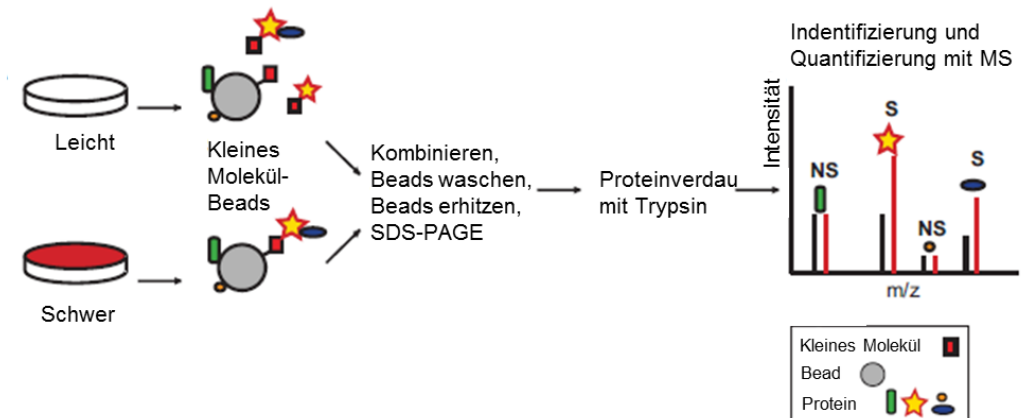


Abbildung 65: SILAC (Stable Isotope Labelling of Amino Acids In Cell Culture), S: spezifisch, NS: nicht spezifisch.^[184]

Unter einer komparativen Affinitätsaufreinigung mit aktiver Substanz (mit leichten Isotopen) und inaktiver Substanz (mit schweren Isotopen), können nach SDS-PAGE und Proteinverdau mit Trypsin gebundene Peptide bzw. Proteine auf Grund der charakteristischen Massenunterschiede der Isotope massenspektrometrisch relativ quantifiziert werden.^[185]

5 Molekulares Network zur Dereplikation

5.1 Entwicklung des Molekularen Networks

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gerwick *et al.* aus La Jolla konnte ein neues Verfahren zur Dereplikation von Naturstoffen, basierend auf dem Vergleich von MS/MS-Daten von Naturstoffen aus einem gewonnenen Extrakt mit schon bekannten isolierten oder synthetisierten Naturstoffen als Standard, entwickelt werden.^[117] MS/MS-Daten sind aussagekräftiger als MS-Daten und konnten dabei effektiv zur Dereplikation eingesetzt werden. In der MS/MS-basierten Dereplikation steht die Annahme dahinter, dass die Kombination aus Struktur, chemischer Stabilität und funktionellen Gruppen die Reaktivität bei kollisionsbedingten Dissoziationen in der Gasphase vorgibt, und somit die Ähnlichkeiten in den MS/MS-Fragmentierungen stellvertretend für die chemischen Ähnlichkeiten stehen. MS/MS-Messungen können ohne großen Aufwand in den Naturstoffisolierungsprozess eingebaut werden, da üblicherweise die Isolierungsprozesse eine LC-MS-Analyse einschließen und MS/MS-Messungen an den meisten Geräten parallel durchgeführt werden können.

5.1.1 Methodenbeschreibung

Das Massenspektrometrie-basierte „Molekulare Networking“ beruht auf der Beobachtung, dass strukturell ähnliche Moleküle auch ähnliche MS/MS-Fragmentierungsmuster aufweisen. Für die Erstellung eines Molekularen Networks zur Dereplikation werden zunächst MS/MS-Spektren der Probe mit einer immensen Anzahl an Verbindungen und einem oder mehreren bekannten Molekülen als Standard („Seed“) aufgenommen (Abbildung 66, A, Step 1).

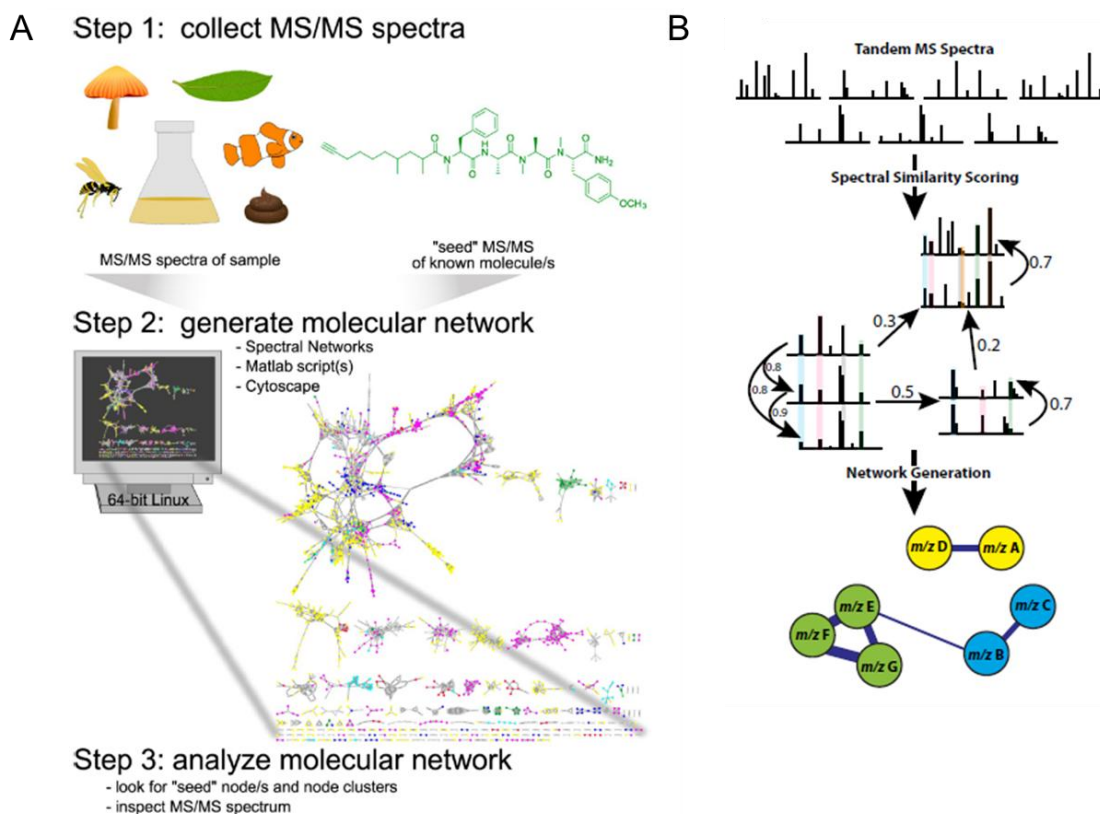


Abbildung 66: Molekulares Network, (A) Arbeitsschritte bis zum Network,^[186] (B) Mathematische Generierung des Networks.^[117]

Der Standard wird dabei parallel zu den anderen Proben als Reinsubstanz vermessen. Aus den Daten werden sogenannte „Cosine Scores“ generiert, die das Maß der Übereinstimmung zweier MS/MS-Spektren darstellen. Diese können anschließend mit Cytoscape, einem kostenlosen Programm, dass für die Darstellung von Zusammenhängen in komplexen Datenmengen entwickelt wurde, visualisiert werden (Abbildung 66, A, Step 2).^[186,187,188] In dem erzeugten Netzwerk stellt ein „Node“ ein gesamtes MS/MS-Spektrum dar und ist mit dem entsprechenden Molekülpeak beschriftet. Eine „Edge“, also eine Verbindung zwischen zwei Nodes, repräsentiert die Beziehung zwischen den beiden MS/MS-Spektren (Abbildung 66, B). Je dicker eine Edge ist, desto größer ist der Wert des Scores. Ein Score kann einen Wert zwischen 0 und 1 besitzen, wobei 1 die völlige Übereinstimmung zweier verglichener MS/MS-Spektren darstellt. Je dicker also die Edges zwischen zwei Nodes sind, desto größer ist die Ähnlichkeit der MS/MS-Spektren und desto größer ist die strukturelle Verwandtschaft der beiden Substanzen. Für eine bessere Übersichtlichkeit wird bei einem Score von unter 0.65, der in dem Programm festgelegt werden kann, die Edge nicht mehr dargestellt. Auch der Abstand zweier Nodes bzw. die Länge einer Edge steht im Zusammenhang mit der Beziehung der Moleküle

zueinander. Zwei eng aneinander liegende Nodes symbolisieren eine größere Ähnlichkeit als zwei weit auseinanderliegende. Da strukturell verwandte Naturstoffe ähnliche MS/MS-Fragmentierungsmuster aufweisen, werden Strukturfamilien zu einem Cluster innerhalb des Netzwerks zusammengefügt. Dadurch können nicht nur bekannte Naturstoffe, sondern auch Derivate einer bekannten Verbindung oder neue Strukturfamilien innerhalb eines oder mehrerer Datensätze aus einer Vielzahl von biologischen Quellen identifiziert werden.^[188] Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass auch kleinste Mengen von Molekülen im Netzwerk dargestellt werden können, die im normalen Isolierungsprozess nicht sichtbar wären. Dadurch lässt sich ein Überblick schaffen, ob neue interessante Derivate einer schon bekannten Strukturklasse oder sogar eine neue Strukturfamilie in der Probe enthalten sind, und eine größere Menge an Rohextrakt benötigt wird, um die Substanzen in ausreichender Menge isolieren zu können.

5.2 Molekulares Network aus Cyanobakterien

Die Anwendung der Methode wurde in Verbindung mit der Isolierung von Naturstoffen aus Cyanobakterien am Scripps Institution of Oceanography (SIO) in La Jolla (San Diego) in der Arbeitsgruppe von Gerwick durchgeführt. Cyanobakterien sind gram-negative Bakterien und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese aus. Früher wurden sie auf Grund morphologischer und physiologischer Merkmale den Algen zugeordnet, besitzen aber im Gegensatz zu den Algen keinen echten Zellkern und gehören als Prokaryoten zu den Bakterien.^[189] Sie kommen in Süßwasser und im feuchten Boden, aber auch in Meereswasser, Baumrinden und Gesteinsoberflächen vor. Zur ersten Vorreinigung der hier untersuchten Cyanobakterien, wurde die Probe in neun Fraktionen mit Hilfe von einer Vakuumflüssigkeitschromatographie (VLC) aufgereinigt um eine höhere Anzahl an Naturstoffen im Network darstellen zu können. Es war dabei von untergeordneter Bedeutung, dass ein neuer Naturstoff oder ein neues Derivat identifiziert wurde, da es sich vorrangig um die Entwicklung der Methode des Networkings in Bezug auf die Naturstoffdereplikation handelte.

5.2.1 Aufarbeitung der Cyanobakterien

Eine 750 mL Probe mit Biomasse des Cyanobakteriums *Moorea* sp., die in Portobelo gesammelt wurde, wurde in einen Büchnertrichter mit 500 mL Erlenmeyerkolben überführt und ausgedrückt. Das Filtrat, bestehend aus Ethanol und Wasser, wurde aufbewahrt und die ausgedrückte Biomasse in eine Metallbox gegeben. Nach Zugabe von 500 mL einer Dichlormethan/Methanol-Mischung (2:1) zu der Biomasse wurde die Mischung für 30 Minuten eingeweicht (Abbildung 67).

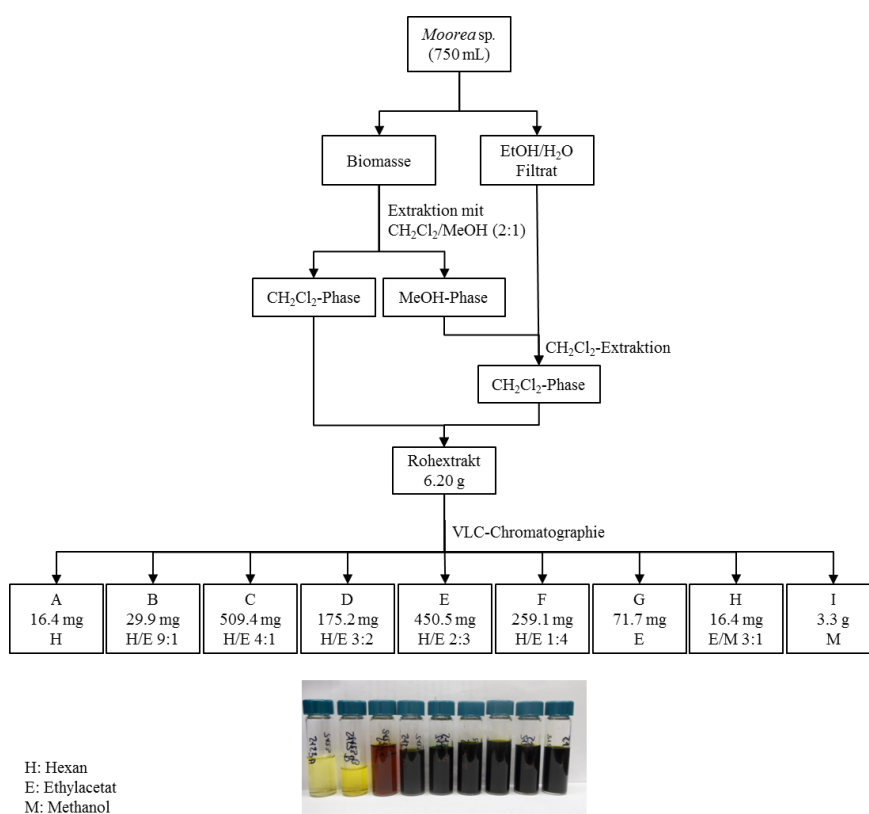


Abbildung 67: Isolierungsschema der Aufarbeitung des Cyanobakteriums *Moorea* sp. (750 mL).

Mit Hilfe einer Saugflasche mit Büchnertrichter wurde die Flüssigkeit mit Unterdruck abgesaugt. Der Schritt des Einweichens und Absaugens wurde sechs Mal wiederholt, bis eine farblose organische Phase erhalten wurde. Dabei wurde die Metallbox jeweils auf eine 35 °C warme Platte gestellt. Das nach dem Absaugen erhaltene Filtrat, bestehend aus einer Methanolphase und einer Dichlormethan-Phase, wurde getrennt und die Methanolphase mit dem Ethanol-Wassergemisch aus dem ersten Extraktionsschritt vereinigt. Beide Phasen wurden eingeeengt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die erhaltenen organischen Phasen wurden mit der zuvor eingeeengten Dichlormethanphase vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Der

Rohextrakt (6.20 g) wurde in wenig Hexan gelöst und im Ultraschallbad gelöst. Mit Hilfe einer Vakuumflüssigkeitschromatographie (VLC) wurde der Rohextrakt in neun Fraktionen aufgetrennt. Dabei wurden Lösungsmittel mit ansteigender Polarität, bestehend aus Hexan, Hexan/Ethylacetat (9:1), Hexan/Ethylacetat (4:1), Hexan/Ethylacetat (3:2), Hexan/Ethylacetat (2:3), Hexan/Ethylacetat (1:4), Ethylacetat, Ethylacetat/Methanol (3:1) und Methanol, verwendet. Das Lösungsmittel der Fraktionen wurde entfernt und die Proben für die LC-MS/MS-Messung vorbereitet.

Die Extraktion einer 1000 mL-Probe einer Mischung aus Cyanobakterien, welche in Portobelo gesammelt wurde, wurde mit der gleichen Methode wie *Moorea* sp. aufgearbeitet (Abbildung 68). Die Prozedur des Einweichens der Biomasse und Absaugens der Flüssigkeit wurde 11 Mal wiederholt. Es konnten 1.95 g Rohextrakt erhalten werden, der in neun Fraktionen mittels Vakuumflüssigkeitschromatographie (VLC) aufgetrennt wurde und die Fraktionen nach Entfernen des Lösungsmittels für die LC-MS/MS-Messung vorbereitet wurden.

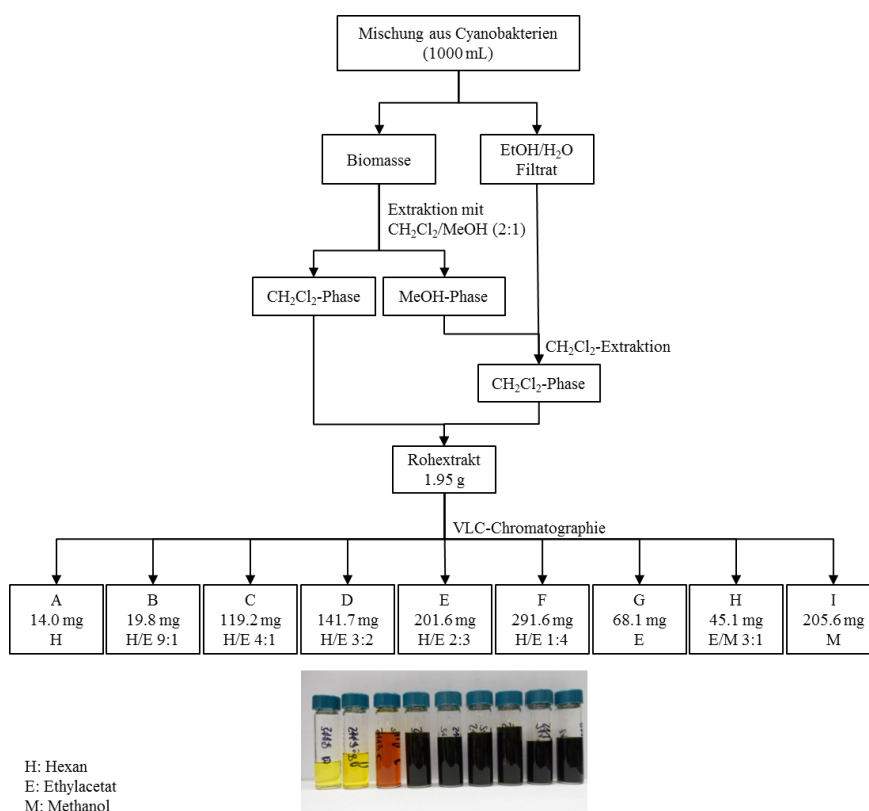


Abbildung 68: Isolierungsschema der Aufarbeitung einer Mischung aus Cyanobakterien (1 L).

5.2.2 Networking

5.2.2.1 Network von *Moorea* sp.

Die erhaltenen neuen Fraktionen wurden für die LC-MS/MS-Messung in Methanol gelöst (1 mg mL^{-1}) und je $20 \text{ }\mu\text{L}$ für die Messung verwendet. Neben den neun Fraktionen wurden auch ein „Blank“ sowie Reinsubstanzen von bekannten Naturstoffen analysiert. Die erhaltenen Messdaten für jede Fraktion und für den „Blank“ wurden in dem Prozess des Molekularen Networkings zusammengefügt. Parallel zu dem Network wurden die Retentionszeiten, MS- und MS/MS-Daten mit einer Datenbank (MarinLit)^[112] und schon isolierten Naturstoffen^[190,191] verglichen, um bekannte Massen zu bestimmen und anschließend mit Hilfe des Networks Derivate zu identifizieren.

In dem Networking wurden die einzelnen Molekülpeaks aller Fraktionen zu einem Netzwerk basierend auf der Ähnlichkeit des Cosine Scores, also den MS/MS-Daten, zusammengefügt. Das erhaltene Network ist in Abbildung 69 abgebildet. Eines der Cluster ist vergrößert dargestellt (Abbildung 69, B). Die Nodes sind abhängig von der Größe der m/z farblich unterteilt und die Edge-Dicke spiegelt die Ähnlichkeit der Cosine Scores wider. Als Reinsubstanzen ist im Cluster Carmabin A zu beobachten (Abbildung 69, B). Es konnte anhand der Zuordnung des Nodes zu der jeweilig analysierten Probe als Carmabin A-Reinsubstanz identifiziert werden. Carmabin A weist ein Molekül-Ion $[\text{M}_\text{A}-\text{NH}_2]^+$ von $m/z = 687.09$ auf. Das Auftauchen von zwei Nodes mit dieser Masse ist auf die unterschiedliche Ionisation zurückzuführen. Die clusternden Molekülpeaks von $m/z = 705.11$ $[\text{M}_\text{B}-\text{NH}_2]^+$ und $m/z = 645.06$ $[\text{M}_\text{C}-\text{NH}_2]^+$ konnten mit Hilfe des Vergleich literaturbekannter Daten den Derivaten Carmabin B und Dragomabin zugeordnet werden.^[192] Die drei Naturstoffe befinden sich in Fraktion H. Carmabin A und Dragomabin wurden 2007 von der Arbeitsgruppe von Gerwick aus *Lyngbya majuscula* isoliert und zeigten antimalarische Aktivitäten gegen den W2 Chloroquin-resistenten Malariastamm.^[192]

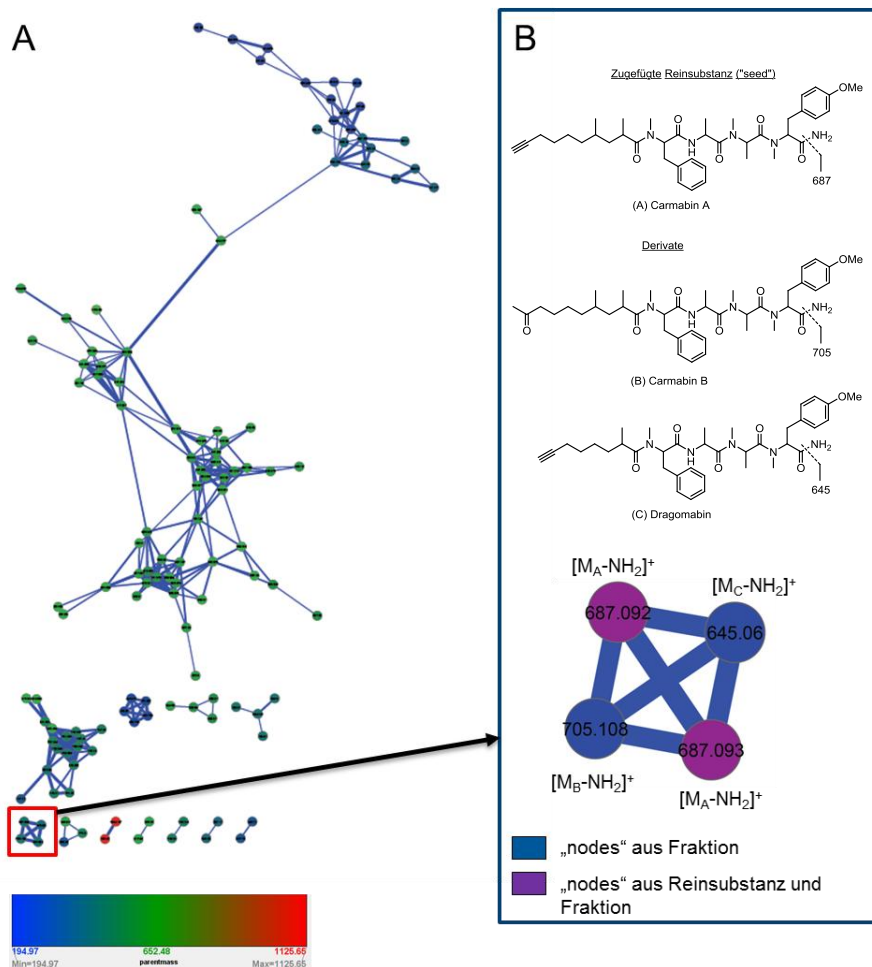
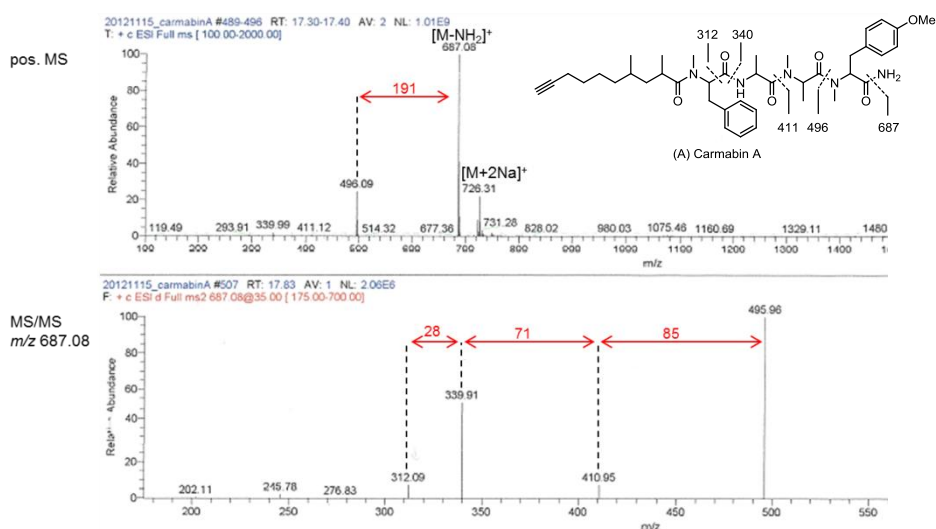


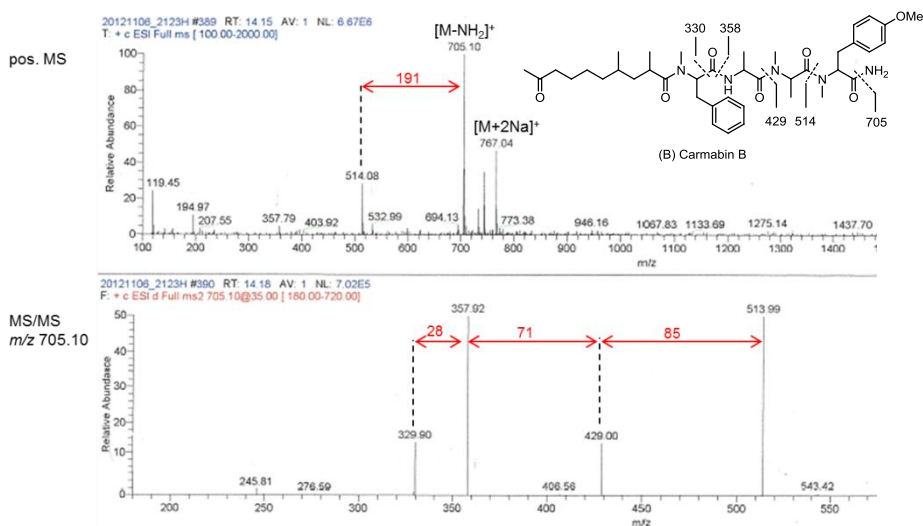
Abbildung 69: (A) Network, generiert aus allen Fraktionen, mit markiertem Cluster, (B) vergrößertes Cluster, blau: „Node“ aus Fraktion, violett: „Node“ sowohl aus Fraktion als auch aus zugefügter Reinsubstanz, (C) Struktur von Carmabin A und Derivaten.

Die Ähnlichkeit der MS/MS-Daten der Derivate wird in Abbildung 70 deutlich, in der die positive Massespur und das MS/MS-Spektrum der Molekülpeaks $[M-NH_2]^+$ jeweils dargestellt sind. Die Massen der Verbindungen sind unterschiedlich, aber die Differenz der einzelnen Fragment-Ionen ist in allen drei Naturstoffen identisch und sie bilden somit einen gemeinsamen Cluster im Network.

(A) Carmabin A



(B) Carmabin B



(C) Dragomabin

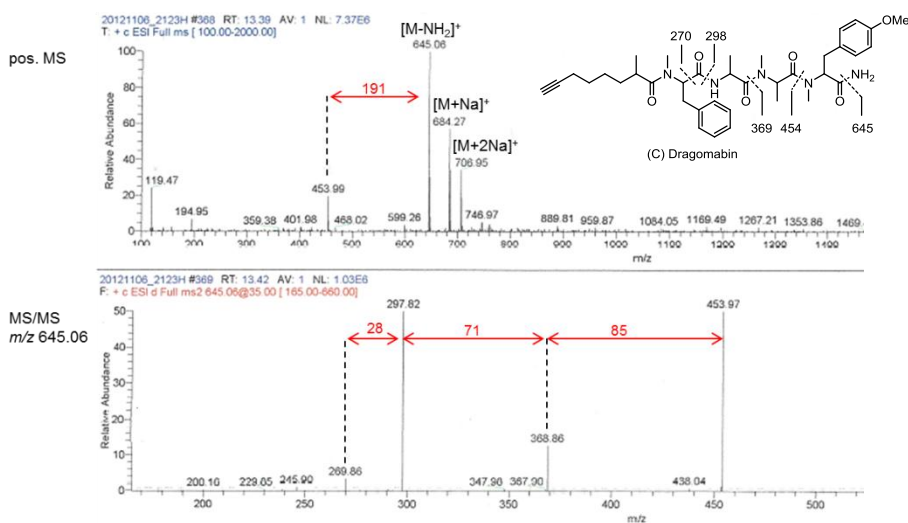


Abbildung 70: MS und MS/MS-Daten von (A) Carmabin A, (B) Carmabin B, (C) Dragomabin.

In dem Network konnten noch zwei weitere Cluster identifiziert werden. Zum einen ein Cluster aus Almiramid A, Almiramid B und Almiramid C (Abbildung 71, A), die sich in Fraktion H befinden und ein Cluster aus Barbamid, welches auch als Reinsubstanz zugegeben wurde, Dechlorobarbamid und 4-O-Demethylbarbamid (Abbildung 71, B) aus Fraktion E und F.

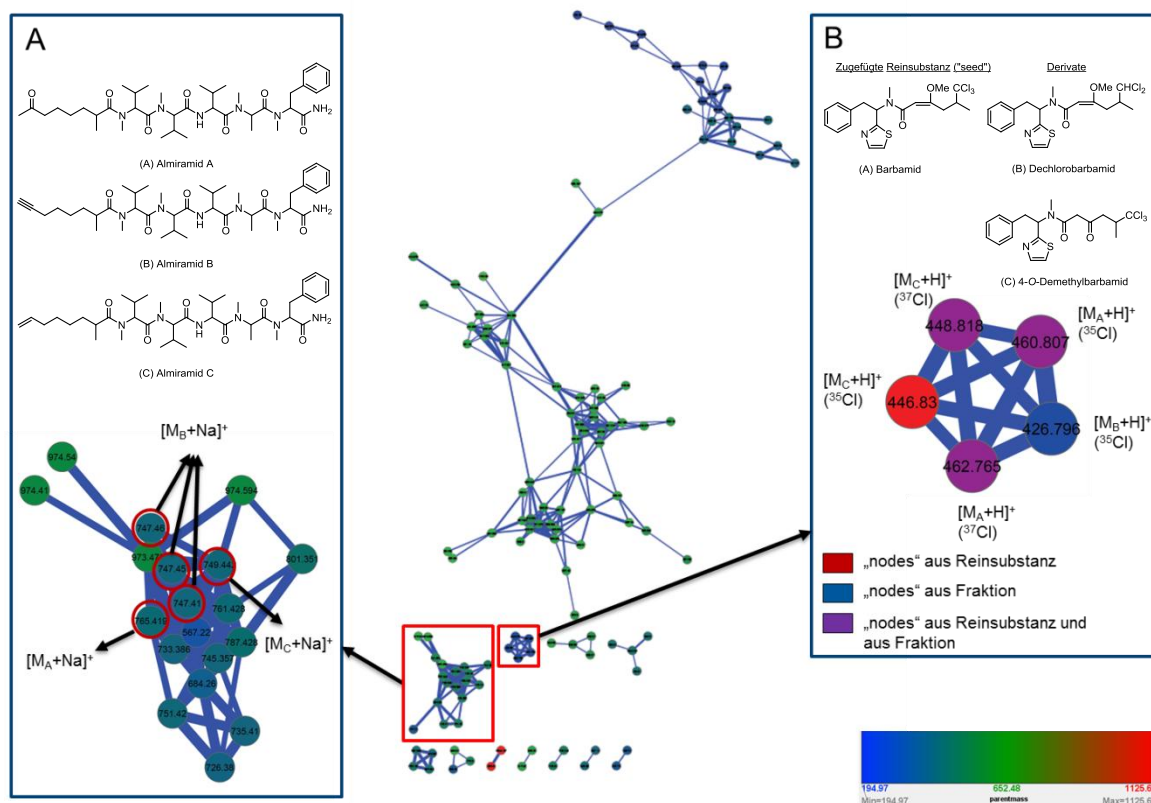


Abbildung 71: Gesamtes Network mit markiertem Cluster, (A) Vergrößertes Almiramid-Cluster, (B) Vergrößertes Barbamid-Cluster.

Die einzelnen MS und MS/MS-Spektren der Nodes werden nicht mehr aufgeführt, sondern befinden sich im Anhang. Die Almiramide tauchen jeweils mit einem Molekülpeak $[M+Na]^+$ auf. Von Almiramid B tauchen auf Grund von Ionisierungseffekten drei Nodes mit einer fast identischen Masse auf. Im Cluster des Networks befinden sich noch weitere Massen, die keinen bekannten verwandten Strukturen zugeordnet werden konnten. Dabei könnte es sich um neue Derivate handeln. Barbamid konnte mittels Zuordnung der aus dem Cluster entnommenen Nodes zu den Peaks im LC-MS-Chromatogramm als Hauptkomponente von Fraktion E und F, Almiramid B als Hauptverbindung in Fraktion H ermittelt werden. Bei zwei kleineren Signalen handelte es sich um Carmabin A und Almiramid C. Die anderen im Cluster

gefundenen Naturstoffstrukturen waren in den Chromatogrammen nicht sichtbar. Dies spiegelt die Sensitivität der Network-Methode wider. Durch diese Methode kann ein Überblick über die Substanzen der Fraktionen geschaffen werden, auch von vielen, kaum detektierbaren Verbindungen.

Bei den detektierten Strukturen handelt es sich um bereits isolierte Naturstoffe. Barbamid konnte von Orjala *et al.* aus *Moorea producens* isoliert werden und zeigte molluskische Aktivität gegen *Biomphalaria glabrata*.^[190] Bei der heterologen Expression des biosynthetischen Genclusters von Barbamid in dem Actinobakterium *Streptomyces venezuela* konnte 4-*O*-Demethylbarbamid erhalten werden und besaß ebenfalls molluskische Aktivität gegen *Biomphalaria glabrata*.^[190] Die Almiramide, die von Sanchez *et al.* aus *Lyngbya majuscula* isoliert wurden, zeigten in vitro Aktivität gegen das Protozoon *Leishmania donovani*.^[193]

5.2.2.2 Network aus einer Cyanobakterienmischung

Das Network aus den neun Fraktionen der aufgearbeiteten Mischung aus marinen Cyanobakterien brachte ein Cluster aus drei Curacinen hervor (Abbildung 72). Die Molekül-Ionen der Curacine sind im Network als $[M+H]^+$ sichtbar.

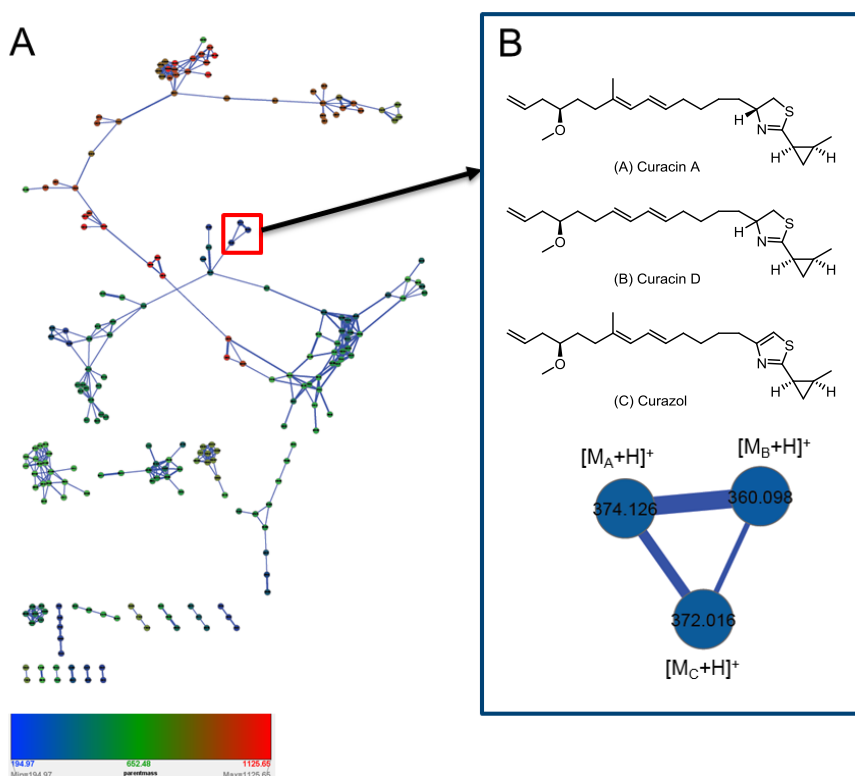


Abbildung 72: (A) Gesamtes Network einer Mischung aus Cyanobakterien, (B) Vergrößertes Curacin-Cluster.

Curacin A besitzt ein Molekulargewicht von 374 g mol^{-1} , während Curacin B sich durch eine fehlende Methylgruppe im Vergleich zu Curacin A auszeichnet. In Curazol liegt eine zweite Doppelbindung im Heterozyklus, eine Thiazol-Einheit, vor.

Curacin A wurde von der Gruppe von Gerwick aus *Lyngbya majuscula* isoliert, ist als Inhibitor der Tubulinpolymerisation bekannt und bindet an die Colchicin-Bindestelle.^[194] Curacin B bindet ebenfalls an die Colchicin-Bindestelle, besitzt aber eine bedeutend geringere Aktivität gegen die Tubulinpolymerisation.^[195]

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gerwick aus La Jolla konnte ein neues Verfahren zur Dereplikation von Naturstoffen, basierend auf MS-MS Daten einer gekoppelten LC-MS-Anlage, entwickelt werden.^[117] Die Methode wurde auf zwei verschiedene Cyanobakterienproben angewendet, die zunächst in neun Fraktionen nach Polarität aufgetrennt und anschließend analysiert wurden. Aus dem Cyanobakterium *Moorea* sp. konnten ein Carmabin-Cluster (bestehend aus Carmabin A, Carmabin B und Dragomabin), ein Almiramid-Cluster (bestehend aus Almiramid A, Almiramid B und Almiramid C) und ein Barbamid-Cluster (bestehend aus Barbamid, Dechlorobarbamid und 4-*O*-Demethylbarbamide) identifiziert werden. Das Network einer Mischung aus Cyanobakterien brachte ein Curacin-Cluster aus Curacin A und D und Curazol hervor.

Durch das Clustern von MS/MS-Daten mit ähnlichem Fragmentierungsmuster im visualisierten Netzwerk, können nicht nur bekannte Naturstoffe, sondern auch Derivate einer bekannten Verbindung oder neue Strukturfamilien innerhalb eines oder mehrerer Datensätze aus einer Vielzahl von biologischen Quellen identifiziert werden.^[188] Außerdem ist es möglich, Naturstoffe und deren Derivate auch in kleinsten Mengen zu detektieren. Dadurch lässt sich ein Überblick schaffen, ob neue interessante Derivate einer schon bekannten Strukturklasse oder sogar eine neue Strukturfamilie in der Probe enthalten sind. Zur endgültigen Bestätigung der Struktur eines neuen Naturstoffs wird die Isolierung und Strukturaufklärung unumgänglich sein, doch das Molekulare Network kann bei der Auswahl eines zur weiteren Aufarbeitung interessanten Extraktes oder einer Fraktion beitragen.

Da die Stämme *Bacillus cereus* und *Metschnikowia pulcherrima* schon hinreichend auf ihre Metabolitenzusammensetzung untersucht worden sind, wurde dort das Molekulare

Network nicht angewendet. Im Falle des Stammes *Sorangium cellulosum* lag der Fokus auf der Isolierung der Spirangiene, welche durch ihr charakteristisches UV-Spektrum leicht zu erkennen waren. Da der Stamm aber in der Vergangenheit viele Naturstoffe hervorgebracht hat, wurde ein Network generiert, um eventuell eine neue Strukturfamilie zu entdecken. In dem Network konnte ein Cluster aus den literaturbekannten Epothilonen A-D beobachtet werden. Weitere Cluster, die relevant gewesen wären, konnten nicht entdeckt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Acros, J. T. Baker, Nova Biochem, Th. Geyer, Roth oder Sigma käuflich erworben. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero bezogen.

Software/ Datenbanken

Dictionary of Natural Products, MarinLit, ACD/ Labs 2012, TopSpin 3.2, ChemBioDraw Ultra 13.0

6.1.1 Instrumentelle Analytik

¹H-NMR-Spektren wurden mit den Geräten AM 300, ARX 400, DPX 400, Avance III 500, DMX 600, Avance III 700 und Avance 900 der Firma Bruker aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden Chloroform-d₁ (CDCl₃), Dimethylsulfoxid-d₆ (DMSO-d₆) oder Methanol-d₄ (CD₃OD) verwendet. Zur Kalibrierung diente der Restprotonengehalt des jeweils angegebenen Lösungsmittels (CDCl₃: δ = 7.27 ppm, DMSO-d₆: δ = 2.50 ppm, CD₃OD: δ = 3.31 ppm) als interner Standard. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm und die Kopplungskonstanten *J* in Hertz (Hz) angegeben. Für die Signalmultiplizitäten gelten folgende Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, br. = breit.

¹³C-NMR-Spektren wurden mit den Geräten AM 300, ARX 400, DPX 400, Avance III 500, DMX 600 und Avance III 700 der Firma Bruker aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden Chloroform-d₁ (CDCl₃), Dimethylsulfoxid-d₆ (DMSO-d₆) oder Methanol-d₄ (CD₃OD) verwendet. Zur Kalibrierung dienten die Restprotonensignale der Lösungsmittel (CDCl₃: δ = 77.00 ppm, DMSO-d₆: δ = 39.56 ppm, CD₃OD: δ = 49.15 ppm) als interner Standard. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben.

Hochaufgelöste **Massenspektren** (ESI-HRMS) wurden mit dem Gerät ESI-TOF-MS (Maxis, Bruker), welches mit einem HPLC-UV-System (1200 Serie) der Firma Agilent kombiniert ist, aufgenommen.

Die **Ultra Performance Liquid Chromatography-QToF-Massenspektren** (UPLC-QToF-MS) wurden mit dem Gerät Q-ToF Premier der Firma Waters aufgenommen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma Waters (Acquity UPLC).

Die **Elektronenspray-Massenspektren** (ESI-MS) wurden mit dem Gerät Micromass LCT der Firma Waters in Kombination mit einer HPLC-Anlage der Firma Waters (Alliance 2695) oder mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Amazon) der Firma Bruker in Kombination mit einem HPLC-UV-System (1200 Serie) der Firma Agilent aufgenommen.

Die **Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-time of flight Massenspektren** (MALDI-TOF) der präparierten Gelbanden wurden mit einem Ultraflex TOF/TOF Gerät der Firma Bruker Daltonik aufgenommen.

Die **LC-MS/MS-Massenspektren** für das Molekulare Network wurden mit einem Surveyor Autosampler-Plus/LC-Pump-Plus/PDA-Plus System (Thermo Finnigan), gekoppelt mit einem LCQ Advantage Max Massenspektrometer (Thermo Finnigan). Es wurde eine Phenomenex-Kinetex C-18 (100x 4.6 mm, 100 Å) Säule und eine Flussrate von 700 $\mu\text{L min}^{-1}$, mit 0.1% Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril (B) als Laufmittel, verwendet (Gradient: 40% B für 5 min, von 40% B zu 100% B in 20 min, 100% B für 10 min, von 100% B auf 40% B in 1 min, 40% B für 3 min). Es wurden drei Scanereignisse eingestellt: 1.) negativ MS (m/z von 800-2000), 2.) positiv MS (m/z von 100-2000), 3.) datenabhängige MS/MS Scans des intensivsten Ions des zweiten Scanereignisses.

Drehwerte $[\alpha]$ wurden an einem Perkin Elmer 241 Polarimeter bei Raumtemperatur und in absolutem Chloroform (Acros), Ethanol (Acros) oder Methanol (J. T. Baker, HPLC grade) bestimmt. Es wurde bei einer Wellenlänge von 589.3 nm (Natrium-D-Linie) in einer Quarzglaszelle mit 1 mL oder 0.3 mL gemessen. Die Drehwerte $[\alpha]$ sind in Grad und die Konzentration c in g 100 mL^{-1} angegeben.

UV-Vis Spektren wurden an einem Shimadzu UV/Vis-2450 Spektrophotometer in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ε ist in $[\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$ angegeben.

6.1.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien (Si 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm, 20x 20 cm) der Firma Merck durchgeführt, die entsprechend der Anzahl der aufzutragenden Proben zurechtgeschnitten wurden. Die anschließende Detektion erfolgte mittels UV Absorption bei 254 nm bzw. 366 nm und/ oder durch Anfärben mit Cer(IV)-sulfat/Phosphormolybdänsäure-Reagenz und anschließendem Entwicklung durch ein Heißluftgebläse.

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 der Firma Machery-Nagel (Korngröße 40 bis 60 μm Durchmesser) unter leichtem Überdruck durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel sowie deren Zusammensetzung sind angegeben.

Als **Adsorberharz** wurde Amberlite[®] XAD-16 verwendet.

Analytische RP-HPLC wurde an einer Anlage der HP 1050 Serie mit einem Fluss von 0.3 mL min^{-1} und einer Detektion mittels Diodenarray-Detektor (DAD) bei spezifischen Wellenlängen (210 nm, 230 nm, 325 nm) durchgeführt. Bei den eingesetzten HPLC-Säulen handelte es sich um eine 125x 2 mm Pyramid C-18 Säule (5 μm) der Firma Machery-Nagel. Für die Laufmittel wurden Acetonitril (J. T. Baker, HPLC grade) und Wasser, welches aus einer Millipore-Anlage abgefüllt und vor Gebrauch filtriert wurde, verwendet. Als Laufmittelgemische dienten:

A: 5% Acetonitril in H₂O, 5 mM NH₄OAc, pH 5,5; B: 95% Acetonitril in H₂O, 5 mM NH₄OAc, pH 5,5; C: 5% Acetonitril in H₂O + 0.1% Ameisensäure; D: Acetonitril. Der Lösungsmittelgradient wurde durch folgende Methoden realisiert:

Gradient A (Laufmittel A und B): von 5% B zu 100% B in 30 min und anschließend 100% B für 10 min.

Gradient B (Laufmittel C und D): von 20% D zu 65% B in 10 min, dann von 65% D zu 100% D in 5 min und anschließend 100% D für 10 min.

Gradient C (Laufmittel C und D): von 10% B zu 100% D in 30 min und anschließend 100% B für 10 min.

Die **Präparative** RP-HPLC-Messungen wurden an einer VarioPrep Nucleodur C-18 Säule (250x 21 mm, 5 μm) mit einem Fluss von 6-10 mL min^{-1} und einer Diodenarray (DAD) Detektion bei 200 bis 500 nm durchgeführt. Für die Laufmittel wurden Acetonitril (J. T. Baker, HPLC grade) und Wasser, welches aus einer Millipore Anlage abgefüllt und vor Gebrauch filtriert wurde, verwendet. Als Laufmittelgemische dienten: A: 5% Acetonitril in H_2O + 0.1% Ameisensäure, und B: Acetonitril. Die Gradienten sind jeweils angegeben.

Gradient 1: 10% B für 5 min, von 10 auf 100% B in 35 min, 100% B für 10 min.

Die Aufarbeitung aus Abschnitt 3.1.1.1 bis 3.1.1.3 wurde mit einer **präparativen RP-HPLC**, die mit einem Detektor (Techlab), einer Doppelkolbenpumpe (Kronlab 2-400), einem Injektor und einem Schreiber (Pharmacia) ausgestattet war. Als Säule wurde eine Nucleodur C-18 5 μm VP 250/21 verwendet. Es wurde bei einem Fluss von 6.7-8.0 mL min^{-1} und einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Der Lösungsmittelgradient wurde je nach Trennproblem variiert (Lösungsmittel A: 5% Acetonitril in H_2O , B: Acetonitril).

6.1.3 Festphasen-Peptidsynthese

Festphasen-Peptidsynthese wurde in einem 50 μmol Maßstab mit einem Syro-multiplen Peptidsyntheseroboter (MultiSynTech, Witten, Germany) auf einem PEG Harz (Rapp Polymere, Tübingen, Germany) mit vorgekoppelten C-terminalen Aminosäuren durchgeführt. Es wurde die Fmoc-Chemie mit TBTU/ Diisopropylethylamin-Aktivierung mit fünffachem Überschuss eingesetzt. Die Kopplungszeit betrug 1 Stunde. Tryptophan wurde über eine Boc-Gruppe geschützt. Die Peptide wurden durch eine dreistündige Behandlung mit TFA (mit 3% Triisopropylsilan und 2% Wasser, 10 mL g^{-1} Harz) vom Harz abgespalten und Seitenketten-entschützt. Nach Ausfällen mit Methyl-*tert*-butylether (MTBE) wurde das erhaltene Rohpeptid über HPLC und MALDI-MS charakterisiert. Die Endprodukte wurden aus Wasser lyophilisiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.1.4 Mikrobiologische Methoden

6.1.4.1 Allgemein

Geräte

Entwicklermaschine für Röntgenfilme	Curix 60 (AGFA) Optimax (ClassicXray)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135TV (Carl Zeiss)
Gelelektrophorese System	Mini PROTEAN System (Bio-Rad)
Heizblock	ThermoStat Plus (Eppendorf)
Laminar Air Flow	Maxisafe 2020 (Thermo Fisher Scientific)
Plattenlesegerät	Infinite M200 pro (Tecan)
Röntgenfilmkassette	Molecular Dynamics
Schüttler	Titramax 1000 (Heidolph) Duomax 1030 (Heidolph) Rotamax 120 (Heidolph)
Semi-dry Transfersystem	Trans-Blot [®] SD (Bio-Rad)
Zählkammer	Cedex XS (Innovatis)
Zellkultur Inkubator	CO ₂ -Auto-Zero (Heraeus) HERACELL 240i (Thermo scientific)
Zentrifugen	Biofuge (Heraeus) 5418R (Eppendorf) 5810R (Eppendorf)
Magnetständer	Dynal [®] MPC-S (Invitrogen)

Software

Cedex XS Software, ChemBioDraw Ultra 13.0, ChemDraw Std 12.0, SigmaPlot 12.3, Metamorph, Image J, Photoshop

Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von Becton Dickinson, Eppendorf, Greiner, Macherey-Nagel, Nunc, Thermo Fisher Scientific, TPP oder Roth käuflich erworben, wenn nicht anders angegeben.

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Alexis Biochemicals, Bayer, Becton Dickinson, Fluka, Gibco, Invitrogen, J. T. Baker, Merck, Roche Diagnostics, Serva, Thermo Fisher Scientific, Roth oder Sigma käuflich erworben.

Antikörper

Anti-IQGAP1	Cell Signaling
Anti-Kaninchen (HRP-gekoppelt)	Cell Signaling
Anti-Tubulin	Klon α 3A2 (Abteilung Zelluläre Proteomforschung HZI)
Anti-Aktin	Sigma
Anti-Tubulin (Überstand)	Synaptic Systems (Klon YL1/2)
Ziege anti-Maus Alexa 594	Molecular Probes/ Invitrogen
Ziege anti-Maus Alexa 488	Molecular Probes/ Invitrogen
Ziege anti-Ratte Alexa 488	Molecular Probes/ Invitrogen

Streptavidin-Konjugate

Streptavidin-FITC (SK1)	Dianova
Streptavidin-Alexa 488 (SK12)	Molecular Probes/ Invitrogen

Streptavidin-Texas Red (SK3)	Dianova
Streptavidin-Alexa 594 (SK13)	Molecular Probes/ Invitrogen

Farbstoffe

Phalloidin Alexa 594	Molecular Probes/ Invitrogen
Dapi	Sigma

Zelllinien

A-549	DSMZ ACC 107	Mensch	Lungenkrebszellen
KB-3-1	DSMZ ACC 158	Mensch	Zervixkarzinomzellen
L-929	DSMZ ACC 2	Maus	Fibroblasten
SK-OV-3	ATCC HTB-77	Mensch	Eierstockkrebszellen
PC-3	DSMZ ACC 465	Mensch	Prostatakrebszellen
MCF-7	DSMZ ACC 115	Mensch	Brustkrebszellen
HUVEC	Lona C2519	Mensch	Nabelvenen-Endothelzellen

Medium

	Medium	Hersteller	Zusätze
L-929	MEM	Gibco	10% FBS (Lonza)
A-549	MEM	Gibco	10% FBS (Lonza)
A-549 (Immun-fluoreszenz)	DMEM	Invitrogen	10% FCS (Sigma) 2 mM Glutamin (Invitrogen) 50 U mL ⁻¹ Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen)
KB-3-1, A-431	DMEM	Lonza	10% FBS (Gibco)
PC-3	F-12 K	Gibco	10% FBS (Gibco)

MCF-7	DMEM	Gibco	1X Nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco) 1.5% Insulin (Gibco) 10% FBS (Lonza)
HUVEC	EGM [®] -2	Lonza	EGM [®] -2 Bullet Kit

Plattendiffusionstests:

<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> K12: NB-Medium:	8 g L ⁻¹ Nutrient Broth
	5 g L ⁻¹ NaCl
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : HA-Medium:	4 g L ⁻¹ Hefeextrakt
	10 g L ⁻¹ Malzextrakt
	4 g L ⁻¹ Glucose

Puffer

10X SDS-Laufpuffer:	288 g Glycin
	60.4 g TrisBase
	20 g SDS
	2 L dest. Wasser

Der Puffer wurde zu 1X mit destilliertem Wasser verdünnt, um den Arbeits-SDS-Laufpuffer herzustellen.

10X TBS-Puffer für Western blot (pH 7,0):	160 g NaCl
	4 g KCl
	12.2 g TrisBase
	2 L dest. Wasser

Der Puffer wurde zu 1X mit destilliertem Wasser verdünnt, um den Arbeits-TBS-Puffer herzustellen. TBST-Puffer wurde durch Zugabe von 1 mL Tween-20 zu 1 L von 1X TBS-Puffer hergestellt.

10X Transfer-Puffer: 25 mM Tris HCl
192 mM Glycin

Der Puffer wurde zu 1X mit destilliertem Wasser verdünnt, um den Arbeits-Transfer-Puffer herzustellen.

Kits

Dynabeads® Streptavidin Trial Kit	Invitrogen
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce® Silver Stain for Mass Spectrometry	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal® West Femto Luminol Solution	Thermo Fisher Scientific

6.1.4.2 Fermentation

Fermentation von IBlü-4 und H24

Die Fermentation wurde in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie (Leibniz Universität Hannover) von I. Reupke durchgeführt. Die Anzuchtbedingungen sind für je 1 L Kulturbrühe beschrieben. Das zur Kulturbrühe zugegebene XAD-Harz wurde zuvor autoklaviert.

Fermentation von IBlü-4 bzw. H24

Die Anzucht der jeweiligen Stämme erfolgte in einer 450 mL Vorkultur in Tryptikase-Soja-Bouillon (TSB, 30 g L⁻¹), die auf zwei 500 mL Erlenmeyerkolben aufgeteilt wurde. Nach Kultivierung für drei Tage bei 27 °C (150 upm) wurde die Hauptkultur in TSB (60 g L⁻¹) und mit 2% Amberlite XAD-16, die in fünfmal 200 mL aufgeteilt war, mit je 20 mL der entsprechenden Vorkultur beimpft und für vier Tage bei 27 °C (150 upm) fermentiert. Die Kulturbrühe wurde mit einem Metallsieb vom XAD-Harz getrennt und das Harz mehrfach mit Wasser gewaschen. Das XAD-Harz wurde in 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 °C gelagert.

Fermentation der Kokultur von IBlü-4 und H24

Für die Fermentation der Kokultur wurden zunächst zwei getrennte Vorkulturen fermentiert. Dazu wurden jeweils zweimal 100 mL Vorkultur in TSB (30 g L^{-1}) in 500 mL Erlenmeyerkolben bei 27°C für drei Tage (150 upm) kultiviert und diese anschließend vereinigt. Die 1 L-Hauptkultur (60 g L^{-1} , 2% XAD-16), aufgeteilt in fünfmal je 100 mL Wasser (mit XAD-16) und 100 mL HA-Medium, wurde mit je 20 mL vereinigter Vorkultur beimpft und für vier Tage bei 27°C (150 upm) fermentiert. Nach Abtrennen des XAD-Harzes von der Kulturbrühe und Waschen mit Wasser, wurde es bei -20°C in 50 mL-Zentrifugenröhrchen gelagert.

Fermentation von So ce90

Die Fermentation wurde von S. Bernecker am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (Abteilung Mikrobielle Wirkstoffe) durchgeführt.

12 L Fermentation

Der Prozess wurde in einem 15 L Glasfermenter mit drei 6-Blattscheibenrührern durchgeführt. Der Sauerstoffeintrag in die Kulturbrühe erfolgte im gesamten Prozess über die Oberfläche bei einem Gasvolumenstrom von 0.5 L min^{-1} . Es wurden drei 100 mL Kolben mit 20 g CY+H/H Medium mit 1.8 mL einer Gefrierkonserve von Stamm So ce90 Wild bei einem pH-Wert von 7,3 angeimpft und 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Eine zweite Vorkultur wurde anschließend mit 30 mL der ersten Vorkultur in zwei 250 mL Kolben mit je 100 g CY+H/H Medium bei einem pH von 7,3 angeimpft und für weitere 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Nach Animpfen von fünf 500 mL Kolben mit je 200 g VY/2S/H Medium mit 20 mL aus der zweiten Vorkultur bei einem pH von 7,3 wurde die dritte Vorkultur 120 Stunden bei 30°C kultiviert. In einem 15 L Fermenter wurden 11 L VY/2S/X-Medium mit 1 L aus der dritten Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit von 240 g Amberlite XAD-16 (Rohm und Haas) bei 30°C , einem pH-Wert von 6,9-7,1 und einem pO_2 -Gehalt von 20% kultiviert. Nach 11 Tagen wurde die Kulturbrühe durch einen Prozessfilter gegeben, um das XAD-16 und die Biomasse von dem Myzel abzutrennen. Es konnte eine Masse von 78 g erhalten werden, die bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingelagert wurde. Es handelte sich nicht um die gesamte Menge an ursprünglich zugegebenem XAD-16, da zur Aufnahme der Produktbildungskinetik sowie

zur Substratverlaufskinetik jeden Tag 1-3 g XAD-16 entnommen wurde. Die Kinetikstudien wurden in diesem Rahmen nicht weiter dargestellt.

70 L Fermentation

Der Prozess wurde in einem 100 L Glasfermenter mit 70 L Arbeitsvolumen und drei 6-Blattscheibenrührern durchgeführt. Der Sauerstoffeintrag in die Kulturbrühe erfolgte im gesamten Prozess über die Oberfläche bei einem Gasvolumenstrom von 3.0 L min^{-1} . Es wurden drei 100 mL Kolben mit 30 g CY+H/H Medium mit 1.8 mL einer Gefrierkonserve von Stamm So ce90 Wild bei einem pH-Wert von 7,3 angeimpft und 72 Stunden bei 30 °C kultiviert. Eine zweite Vorkultur wurde anschließend mit 10 mL der ersten Vorkultur in drei 250 mL Kolben mit je 100 g CY+H/H Medium bei einem pH von 7,3 angeimpft und für weitere 24 Stunden bei 30 °C kultiviert. Nach Animpfen von drei 250 mL Kolben mit je 100 g CY+H/H Medium mit 10 mL aus der zweiten Vorkultur bei einem pH von 7,3 wurde die dritte Vorkultur 120 Stunden bei 30 °C kultiviert. Aus der zweiten Vorkultur wurden noch zwei weitere 250 mL Kolben wie die vorherigen drei Kolben angeimpft und 96 Stunden bei 30 °C kultiviert. Eine vierte Vorkultur wurde anschließend mit 10 mL der dritten Vorkultur in zehn 250 mL Kolben mit je 100 g CY+H/H Medium bei einem pH von 7,3 angeimpft und für 72 Stunden bei 30 °C kultiviert. Nach Animpfen von zehn 1000 mL Kolben mit je 400 g VY/2S/H Medium mit 100 mL aus der vierten Vorkultur bei einem pH von 7,3 wurde die fünfte Vorkultur 120 Stunden bei 30 °C kultiviert. In einem 100 L Fermenter wurden 65 L VY/2S/X-Medium mit 5 L aus der fünften Vorkultur angeimpft und in Anwesenheit von 1.4 kg Amberlite XAD-16 (Rohm und Haas) bei 30 °C, einem pH-Wert von 6,9-7,1 und einem pO_2 -Gehalt von 20% kultiviert. Nach 9 Tagen wurde die Kulturbrühe durch einen Prozessfilter gegeben, um das XAD-16 und die Biomasse von dem Myzel abzutrennen. Es konnten eine Masse von 727 g erhalten werden, die bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingelagert wurde. Es handelte sich nicht um die gesamte Menge an ursprünglich zugegebenem XAD-16, da zur Aufnahme der Produktbildungskinetik sowie zur Substratverlaufskinetik jeden Tag 1-3 g XAD-16 entnommen wurde. Die Kinetikstudien wurden in diesem Rahmen nicht weiter dargestellt.

6.1.4.3 Bioaktivitätstests

Zytotoxizitätstests

Die L-929-Mausfibroblasten (DSMZ ACC2) wurden bei 37 °C und 10% CO₂ in DMEM-Medium mit 10% FBS kultiviert. Die Wachstumsinhibition wurde in 96-Well Mikrotiterplatten gemessen. Dazu wurden eine Verdünnungsreihe angesetzt und jeweils 60 µL der Testsubstanz zu 120 µL Aliquoten der suspendierten Zellen (50 000 mL⁻¹) in jedes Well pipettiert. Nach fünf Tagen wurde die Inhibierung der Zellen über einen MTT-Test bestimmt. Dazu wurden 20 µL MTT in PBS mit einer Endkonzentration von 0.5 ng mL⁻¹ zugegeben und für 2 Stunden inkubiert. MTT wird dabei von Dehydrogenasen der Zellen reduziert und bildet violette Formazankristalle. Der entstandene Niederschlag wurde mit 100 µL PBS gewaschen und in 100 µL Isopropanol (0.4% HCl) gelöst. Die Absorption wurde bei 595 nm mit Hilfe eines Plattenlesegeräts spektrometrisch gemessen.

Plattendiffusionstests

Die Plattendiffusionstests wurden in Kooperation mit I. Reupke vom Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Dazu wurden Agarplatten mit drei verschiedenen Testorganismen angeimpft und die mit 10 µL Substanzlösung (in Methanol, c = 1 mg mL⁻¹) getränkten Filterplättchen, die zuvor steril getrocknet wurden, auf die Agarplatten gelegt. Als Testorganismus diente das gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis*, das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* K12 und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Agarplatten wurden 24 Stunden bei 37 °C (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12) bzw. bei 25 °C (*Saccharomyces cerevisiae*) inkubiert.

Die Agarplatten wurden mit einer Unterschicht aus Nährmedium (mit 15 g L⁻¹ Agar) und einer Oberschicht aus Nährmedium (mit 15 g L⁻¹ Agar und Testorganismus) befüllt. Die Testorganismen *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* wurden über Nacht fermentiert (NB- bzw. HA-Medium) und die optische Dichte (OD) der Mikroorganismen für die Oberschichten eingestellt (*Escherichia coli* K12: OD = 1, *Saccharomyces cerevisiae*: OD = 5). Zur Vorbereitung der Oberschicht im Falle von *Bacillus subtilis* wurden Sporen, die bei -20 °C gelagert wurden, aufgetaut und in das Medium der Oberschicht gegeben. Für das Gießen der Schichten der Agarplatten wurden Kippautomaten verwendet.

6.1.4.4 Zellkulturarbeiten

Die Kultivierung der Zellen erfolgte steril. Das DMEM-Medium wurde vor der Verwendung auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Größe 75 cm² und 175 cm² bei 37 °C und 10% CO₂ kultiviert. Zum Subkultivieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, 10 mL Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Gibco) zugegeben und durch Schwenken verteilt. Das EBSS wurde abgenommen und 1.8 mL Trypsin vorsichtig zugetropft. Nach 2-minütiger Inkubation mit Trypsin bei Raumtemperatur wurde die Zellkulturflasche 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 10 mL frisches Medium zugegeben und das Zell-Medium-Gemisch in neue Kulturflaschen, gefüllt mit frischem Kulturmedium, überführt.

6.1.4.5 Herstellung des Zelllysats

Die Zellen wurden mit einem Plastikspatel unter sterilen Bedingungen von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgeschabt und zusammen mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 3000 g bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Es wurden je nach Menge des Zelniederschlags 600 bis 1000 µL MPER-Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific) sowie 1 µL HALT Protease/ Phosphatase-Inhibitor (Roche) zugegeben, 15- bis 20-mal auf- und abpipettiert und in ein 1.5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 4 °C und 1400 rpm wurden die mittlere Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und das Zelllysats bei -20 °C gelagert.

6.1.4.6 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Zur Bestimmung des Proteingehalts des Zelllysats wurde das Bicinchoninsäure (BCA)-Protein-Assay-Kit verwendet. Dazu wurden die Rinderserumalbumin (BSA)-Standards in den Konzentrationen 0/ 125/ 250/ 500/ 750/ 1000/ 1500 und 2000 µg mL⁻¹ für die Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Je nach benötigtem Volumen an BCA-Arbeitslösung, welche immer frisch hergestellt wurde, wurden 50 Teile BCA-Reagenz A mit einem Teil BCA-Reagenz B gemischt und bis zur Verwendung im Dunkeln aufbewahrt. Vom Zelllysats wurden eine 1:5 und eine 1:10 Verdünnung hergestellt. In eine 96-Well-Platte wurden in elf Wells jeweils 200 µL BCA-Arbeitslösung pipettiert und je 25 µL der BSA-Standard-Verdünnungen sowie des Lysats und deren beiden Verdünnungen hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C für 30 Minuten

inkubiert. Mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesers wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und über die erhaltene Standardkurve die Proteinkonzentration des Zelllysats bestimmt.

6.1.4.7 Pulldown Assay

KB-3-1-Zellen wurden in Zellkulturflaschen bis zu einer 60-70%-igen Konfluenz kultiviert. Nach Abschaben der Zellen und Lysis mit MPER-Lysepuffer wurde die Konzentration des Zelllysats bestimmt. Das Lysat wurde auf vier 1.5 mL Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, so dass eine Menge von 2 mg Protein in jedem Gefäß vorlag. Es wurden 4 µL Spirangien A (1 mg mL^{-1}) in die Gefäße 3 und 4 sowie 4 µL Methanol in die Gefäße 1 und 2 pipettiert. Alle vier Reaktionsgefäße wurden für eine Stunde auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden in Gefäß 2 und 3 je 4 µL biotinyliertes Spirangien A (1 mg mL^{-1}) und in Gefäß 1 und 4 je 4 µL Methanol gegeben. Während einer erneuten 1-stündigen Inkubation auf Eis wurden die Dynabeads[®] vorbereitet. Je nach Art der verwendeten Beads wurden diese unterschiedlich behandelt. Dynabeads[®] M-280 sowie MyOneT1 wurden in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gefüllt, dreimal 5 Minuten mit 1 mL PBS gewaschen, auf vier neue 1.5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und zweimal 5 Minuten mit 1 mL PBS gewaschen. Dynabeads[®] M-270 sowie MyOneC1 sind nicht mit BSA geblockt und wurden daher in ein Reaktionsgefäß überführt und einmal 3 Minuten mit 1 mL PBS gewaschen. Nach Zugabe von weiteren 1 mL PBS wurden die Beads auf vier neue 1.5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und 5-mal mit 0.1% BSA-Lösung in PBS (je 250 µL) blockiert. Zu den vorbereiteten Dynabeads[®] wurden die jeweiligen Lysate pipettiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden für 3 Minuten in einen Magnetständer gestellt, um die Beads an der Wand des Gefäßes zu sammeln. Anschließend wurde das Lysat verworfen und die Beads fünfmal mit 1 mL PBS für je 5 Minuten gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Dabei wurden die Gefäße nach jedem Waschvorgang wieder in den Magnetständer gestellt. Nach dem 5-maligen Waschen wurde das PBS abgenommen, die Beads mit 60 µL 4X SDS loading dye (Roth) gemischt und für 12 Minuten auf 96 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben 10 Sekunden bei 1400 rpm zentrifugiert und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

6.1.4.8 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurde ein fertig gegossenes Gel (4-20% Tris-HCl Gel) der Firma Bio-Rad verwendet. Es wurden 20 µL Probe sowie 6 µL des Markers (Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 150 V bis zum Erreichen der Markerfront bis zur gewünschten Position durchgeführt.

6.1.4.9 Western Blot

Das erhaltene Gel aus der SDS-PAGE wurde über eine Semi-dry Western Blot Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden die Nitrozellulosemembran (Whatman[®], Schmidt) und vier Whatman-Filter (Fisher Scientific) in 6.3x 9.3 cm große Stücke geschnitten. Die Membran, die Filter und das Gel wurden für 30 Minuten in 1X Transferpuffer mit 20% Methanol unter leichtem Schütteln getränkt. Zur Durchführung des Transfers wurden zwei Filterpapiere, darauf die Membran, das Gel und abschließend wieder zwei Filterpapiere aufeinander gelegt. Um Luftblasen zu entfernen wurde mit einer gekürzten Glaspipette mit leichtem Druck über den geschichteten Stapel gerollt. Der Transfer wurde in 30 Minuten bei 15 V und 500 mA durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Transferkassette entfernt und in Blockierlösung (5% BSA in TBST) für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Danach wurde die Membran für 30 Sekunden mit TBST gewaschen und mit dem ersten Antikörper (Anti-IQGAP1) für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 6-maligem Waschen mit TBST für jeweils 5 Minuten unter starkem Schwenken wurde die Membran eine Stunde mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt) bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen und die Banden mittels Chemilumineszenz detektiert. Dazu wurde das Supersignal-West-Femto-Maximum-Sensitivity-Substrate-Kit verwendet. Die Membran wurde in einer 1:1 Mischung aus Luminol/ Enhancer-Lösung und Stable-Peroxidpuffer (insgesamt 1 mL) in einer Kunststoffbox 5 Minuten inkubiert und in eine Röntgenfilmentwicklungskassette überführt. Im Dunkelraum mit Rotlicht wurde ein Röntgenfilm zugeschnitten, in die Kassette auf die Membran gelegt und eine

bestimmte Zeit lang inkubiert. Der Film wurde mit einer Röntgenentwicklermaschine im Dunkeln entwickelt.

6.1.4.10 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit dem Pierce[®] Silver Stain Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Das SDS-Gel wurde aus der Elektrophorese-Kassette entfernt und zweimal mit Millipore Wasser für 5 Minuten gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden unter leichtem Schwenken durchgeführt. Das Gel wurde zweimal 15 Minuten in Fixierlösung aus 30% Ethanol, 10% Essigsäure und 60% Wasser oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde zweimal 5 Minuten mit 10% Ethanol und zweimal 5 Minuten mit Millipore Wasser gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die Sensitizer-Arbeitslösung aus 50 µL Silver-Stain-Sensitizer mit 25 mL Millipore Wasser hergestellt. Es wurde für 1 Minute in der Sensitizer-Arbeitslösung inkubiert und zweimal mit Wasser für jeweils 1 Minute gewaschen. Danach wurde das Gel 5 Minuten in frisch hergestellter Silver-Stain-Enhancer-Lösung (0.25 mL Enhancer und 25 mL Silver-Stain) inkubiert und in der Zwischenzeit die Developer-Arbeitslösung aus 0.25 mL Enhancer und 25 mL Developer-Lösung hergestellt. Das Gel wurde zweimal in Wasser für 20 Sekunden gewaschen und die Developer-Arbeitslösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Minuten bis zum Erreichen einer optimalen Färbung der Banden wurde 5% Essigsäure als Stopplösung zugegeben. Die Lösung wurde nach kurzem Waschen nochmals durch Stopplösung ersetzt und 10 Minuten inkubiert. Unmittelbar danach wurde die Entfärbung durchgeführt.

Dazu wurde das Gel zweimal in Millipore Wasser für 10 Minuten gewaschen und die gewünschten Banden mit einem Skalpell unter einer Lichtbox ausgeschnitten. Diese wurden in 0.5 mL Mikroreaktionsgefäße überführt. Für die Entfärbung wurden 74 µL Silberentfärber-Reagenz A, 245 µL Silberentfärber-Reagenz B und 4 mL Millipore Wasser vermischt. Diese Menge war zur Behandlung von 10 Gelbanden geeignet und wurde je nach Anzahl der Gelbanden in der Menge angepasst. Die Lösung wurde immer frisch hergestellt und noch am gleichen Tag verwendet. Zu den ausgeschnittenen Gelbanden wurden zweimal 0.2 mL der Entfärberlösung zugegeben, vorsichtig gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 10 Minuten mit 0.2 mL Waschlösung (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50% Acetonitril) gewaschen und zur MALDI-TOF-Messung abgegeben.

6.1.4.11 MALDI-TOF-Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung und die MALDI-TOF-Messungen wurden von der Arbeitsgruppe Zelluläre Proteomforschung (HZI Braunschweig) durchgeführt. Dazu wurde das Gel mit Wasser gewaschen, mit Acetonitril dehydriert und mit Trypsin verdaut. Anschließend wurde eine Peptid-Extraktion durch Inkubation mit Acetonitril und 5% Ameisensäure durchgeführt. Der eingeeengte Überstand wurde in 32% Methanol/ 0.25% Ameisensäure aufgenommen, 1 µL der Probe auf die MALDI-Target-Plate (Prespotted AnchorChip, PAC) aufgetragen und vermessen. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Mascot (Matrix Science).

6.1.4.12 Immunfluoreszenz

Die Zellen (KB-3-1, L-929 und A-549) wurden auf 12 mm Deckgläschen kultiviert. Dazu wurde zunächst die benötigte Anzahl an sterilen Deckgläschen in je ein Well einer 24-Well-Platte gelegt, für zwei Stunden mit Poly-D-Lysin (Sigma) beschichtet und die Zellen über Nacht in 1 mL frischem Medium pro Well bei 37 °C und 7.5% CO₂ kultiviert. Für jede Zelllinie wurden je nach Anzahl der unterschiedlichen Färbe- und Fixiermethoden mehrere Reihen von Zellkulturen in der Platte angesetzt. Am nächsten Tag wurde 1 µL biotinyliertes Spirangien A (**B-S1**) gelöst in Methanol zugegeben, wobei die Endkonzentration der jeweiligen IC₃₀-, IC₅₀- und IC₉₀-Konzentration der entsprechenden Zelllinie entsprach. Zur Kontrolle wurde in je ein Well Methanol gegeben. Die Konzentrationen der Stammlösungen sind in folgender Tabelle angegeben:

Tabelle 20: Stammlösungen von biotinyliertem Spirangien A (B-S1).

	IC ₃₀ -Stammlösung [µg mL ⁻¹]	IC ₅₀ -Stammlösung [µg mL ⁻¹]	IC ₉₀ -Stammlösung [µg mL ⁻¹]
L-929	6	13	30
KB-3-1	3	5	11
A-549	0.7	1.6	4.1

Nach Zugabe von biotinyliertem Spirangien A wurde 20 Stunden bei 37 °C und 7.5% CO₂ inkubiert. Alle folgenden Fixier- und Waschvorgänge, die in der 24-Well-Platte ausgeführt wurden, wurden mit einem Volumen von 0.5 mL pro Well durchgeführt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit verschiedenen Methoden fixiert.

Fixiermethode 1: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA, Sigma) in PBS fixiert und nach Waschen mit PBS für 5 Minuten mit PBS (0.15% Triton-X100) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1% BSA in PBS (0.05% Tween-20) für eine Stunde geblockt.

Fixiermethode 2: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in MeOH (+ 1 mM in EGTA) für 15 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach Fixierung in 4% PFA in PBS für 20 Minuten wurde mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit 1% BSA in PBS (0.05% Tween-20) geblockt.

Fixiermethode 3: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 70% MeOH/ 30% Aceton für 20 Minuten bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit 1% BSA in PBS (0.05% Tween-20) geblockt.

Fixiermethode 4: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 10% Formaldehyd in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS und Permeabilisieren mit PBS (0.15% Triton-X100) für 5 Minuten wurden sie für eine Stunde mit 1% BSA in PBS (0.05% Tween-20) geblockt.

Fixiermethode 5: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 4%/ 0.02% Glutaraldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen, mit PBS (0.15% Triton-X100) für 5 Minuten permeabilisiert und für eine Stunde mit 1% BSA in PBS (0.05% Tween-20) geblockt.

Nach der entsprechenden Fixiermethode wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper, der in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung (PBS +1% BSA und 0.05% Tween-20) gelöst wurde, inkubiert. Dazu wurde eine Naßkammer mit einer Parafilm-Folie ausgelegt und die benötigte Anzahl an Tropfen von je 30 µL des Antikörpers auf die Folie pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Pinzette mit der Oberseite, an der die Zellen hafteten, nach unten auf die Antikörpertropfen gelegt und im Dunkeln für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Entnehmen aus der Naßkammer und Überführen in die 24-Well-Platte, wobei die Deckgläschen in die ursprüngliche Position zurück gedreht wurden, wurden die Zellen viermal 5 Minuten mit PBS (0.05% Tween-20) gewaschen. Anschließend wurden sie auf die gleiche Weise mit dem zweiten Antikörper in der Naßkammer im Dunkeln für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die

Deckgläschen wieder unter Umdrehen in die 24-Well-Platte überführt. Die Zellen wurden dreimal für 5 Minuten mit PBS (0.05% Tween-20) und einmal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Dehydrierung wurden sie anschließend für jeweils 1 Minute mit 70% Ethanol und mit 100% Ethanol inkubiert. Die Deckgläschen wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus der 24-Well-Platte genommen und auf ein Zelltuch zum Trocknen gelegt. Es wurden Objektträger mit 70%-igem Ethanol gesäubert und entsprechend der Anzahl der Deckgläschen kleine Tropfen von auf 60 °C erwärmten Mowiol (2.4 g Mowiol, 6 g 87% Glycerol, 0.2 ml 200 mM Tris pH 8.5, 6 ml H₂O), das Anti-bleach (25 mg mL⁻¹ *n*-Propylgallat in 87% Glycerol (Sigma)) enthält, auf die Objektträger aufgetragen. Die getrockneten Deckgläschen wurden mit der Zelloberfläche nach unten auf die Mowioltropfen gelegt und die Objektträger im Dunkeln zunächst in waagerechter Position aufbewahrt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie deren Verdünnung sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 21: Liste der verwendeten primären Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Beschreibung	Protein	Verdünnung
α3A2	anti-Tubulin	1: 1000
A2066	anti-Aktin	1: 200
YL1/2	anti-Tubulin	Überstand

Tabelle 22: Liste der verwendeten sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Beschreibung	Protein	Verdünnung
SK1	Streptavidin FITC	1: 200
SK12	Streptavidin Alexa 488	1: 200
SK3	Streptavidin Texas Red	1: 100
SK13	Streptavidin Alexa 594	1: 100
PH13	Phalloidin Alexa 594	1: 80
A13c	Ziege anti-Maus Alexa 594	1: 250
B12c	Ziege anti-Kaninchen Alexa 488	1: 200
C12c	Ziege anti-Ratte Alexa 488	1: 200
DAPI	Dapi	1: 400

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem inversen Mikroskop (Axiovert 100TV) mit einer Standard-Epifluoreszenzbeleuchtung (Lichtquelle HXP120, Carl Zeiss) und einem 100x/NA1.4 plan-apochromatischen Objektiv durchgeführt. Die Bilder wurden mit Hilfe einer hinterbeleuchteten, einer gekühlte ladungsträgergekoppelte Schaltung enthaltenen,

Kamera (CoolSNAP HQ2, Photometrics) erhalten, die mit einer Metamorph Software (Molecular Device Coro.) gesteuert wurde.

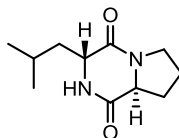
6.1.5 Molekulares Netzwerk

Die gemessenen Daten aus der LC-MS-Analyse wurden in ein mzXML-Format umgewandelt, ein Text basiertes Format, das die Daten aus der Massenspektrometrie wie die Scannummer, Vorläufer- m/z , m/z und Intensität jedes erhaltenen MS/MS-Ions beschreibt. Dazu wurde das Programm msconvert (ProteoWizard Paket) verwendet.^[196] Die mzXML-Textdateien wurden der MS-Clusterbildung^[197] unterzogen und mit Hilfe von MATLAB-Textdateien mit Attributen generiert. Diese wurden zur Visualisierung in Cytoscape 2.8.3 importiert.^[186]

6.2 Charakterisierung der Verbindungen

6.2.1 2,5-Diketopiperazine

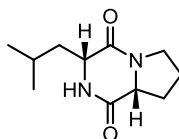
Cyclo-(L-Pro-D-Leu) (D1.1)



Farbloser Feststoff; 26.2 mg; $t_R = 5.2$ min (analytische RP-HPLC, Gradient C); $R_f = 0.38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = -70$ ($c = 1.1$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.93 (1H, br. s.), 4.11 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 4.01 (1H, dd, $J = 9.5, 3.7$ Hz), 3.60 (1H, m), 3.53 (1H, ddd, $J = 12.0, 8.8, 3.7$ Hz), 2.35 (1H, dtd, $J = 12.8, 7.0, 2.9$ Hz), 2.13 (1H, m), 2.06 (1H, ddd, $J = 14.2, 9.8, 3.9$ Hz), 2.01 (1H, m), 1.90 (1H, ddtd, $J = 12.8, 10.6, 8.8, 7.0$ Hz), 1.75 (1H, m), 1.52 (1H, ddd, $J = 14.5, 9.5, 5.0$ Hz), 1.00 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 166.1, 59.0, 53.4, 45.5, 38.6, 28.1, 24.7, 23.3, 22.7, 21.2 ppm; UPLC-MS (QToF-Premier): berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$: 211.1447, gefunden 211.1443.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^{[126],[127]} überein.

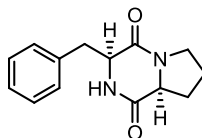
Cyclo-(D-Pro-D-Leu) (D1.2)



Farbloser Feststoff; 11.2 mg; $t_R = 4.38$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.27$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = +80$ ($c = 1$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.38 (1H, br. s.), 4.08 (1H, dd, $J = 9.2, 7.0$ Hz), 3.92 (1H, ddd, $J = 9.3, 5.5, 4.4$ Hz), 3.64 (1H, m), 3.52 (1H, ddd, $J = 11.5, 8.7, 2.8$ Hz), 2.40 (1H, m), 2.02 (2H, m), 1.87 (1H, m), 1.77 (1H, m), 1.65 (2H, m), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 169.4, 166.3, 58.0, 56.4, 45.6, 42.6, 29.0, 27.5, 23.0, 22.2, 21.4 ppm; ESI-MS: berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$: 211.1447, gefunden 211.1447.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[126,127] überein.

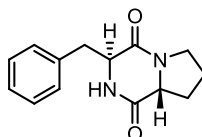
Cyclo-(L-Pro-L-Phe) (D2.1)



Farbloser Feststoff; 13.3 mg; $t_R = 3.22$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = -83$ ($c = 0.22$, EtOH); UV (analytische HPLC): λ_{max} 202 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (3H, m), 7.23 (2H, d, $J = 7.12$ Hz), 5.61 (1H, br. s.), 4.27 (1H, dd, $J = 10.7, 3.6$ Hz), 4.08 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.61 (3H, m), 2.78 (1H, dd, $J = 14.2, 10.7$ Hz), 2.34 (1H, m), 2.01 (2H, m), 1.91 (1H, m) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 169.3, 165.1, 136.0, 129.3, 129.1, 127.5, 59.1, 56.2, 45.5, 36.8, 28.3, 22.5 ppm; UPLC-MS (QToF-Premier): berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: 267.1109, gefunden 267.1108.

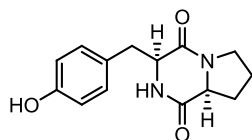
Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[126,129] überein.

Cyclo-(D-Pro-L-Phe) (D2.2)



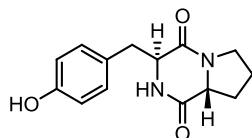
Farbloser Feststoff; 4.5 mg; $t_R = 2.56$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.27$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = +24.7$ ($c = 0.6$, EtOH); UV (analytische HPLC): λ_{max} 202 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.30 (3H, m), 7.22 (2H, m), 5.86 (1H, br. s.), 4.20 (1H, dt, $J = 6.6, 4.1$ Hz), 3.64 (1H, dt, $J = 12.2, 8.4$ Hz), 3.41 (1H, ddd, $J = 12.1, 9.0, 2.8$ Hz), 3.10 (2H, m), 3.05 (1H, m), 2.20 (1H, m), 1.95 (1H, m), 1.83 (1H, m), 1.72 (1H, m) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$: 245.1290, gefunden 245.0674.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[126] überein.

Cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (D3.1)

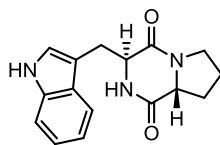
Farbloser Feststoff; 8.4 mg; $t_R = 1.82$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.24$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = -54$ ($c = 1.11$, EtOH); UV (analytische HPLC): λ_{max} 276, 220, 207 nm; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.05 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.78 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.86 (1H, br.s.), 4.22 (1H, dd, $J = 10.2, 2.8$ Hz), 4.08 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 3.59 (2H, m), 3.47 (1H, dd, $J = 14.5, 4.0$ Hz), 2.77 (1H, dd, $J = 14.6, 10.1$ Hz), 2.34 (1H, m), 1.97 (3H, m) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 169.7, 165.2, 155.6, 130.3, 127.0, 116.1, 59.1, 56.2, 45.4, 35.9, 28.3, 22.5 ppm; UPLC-MS (QToF-Premier): berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: 283.1059, gefunden 283.1059.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[59,126] überein.

Cyclo-(D-Pro-L-Tyr) (D3.2)

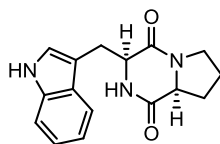
Farbloser Feststoff; 3.0 mg; $t_R = 1.86$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.24$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = +53$ ($c = 0.77$, EtOH); UV (analytische HPLC): λ_{max} 276, 224, 202 nm; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.89 (1H, s), 6.97 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.71 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.14 (1H, t, $J = 4.4$ Hz), 3.53 (1H, m), 3.34 (1H, m), 3.11 (1H, dd, $J = 13.8, 4.2$ Hz), 2.87 (1H, dd, $J = 13.8, 4.6$ Hz), 2.61 (1H, dd, $J = 10.4, 6.2$ Hz), 2.06 (1H, m), 1.89 (1H, m), 1.65 (2H, m) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 171.4, 167.6, 158.3, 132.3, 127.0, 116.4, 59.9, 59.2, 46.1, 40.2, 29.8, 22.5 ppm; UPLC-MS (QToF-Premier): berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: 261.1239, gefunden 261.1239.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[126,130] überein.

Cyclo-(D-Pro-L-Trp) (D4.1)

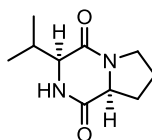
Farbloser Feststoff; 3.3 mg; $t_R = 3.02$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.22$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = +106$ ($c = 0.88$, EtOH); UV (analytische HPLC): λ_{max} 281, 219, 202 nm; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.89 (1H, s), 7.50 (1H, m), 7.35 (1H, m), 7.10 (1H, m), 7.01 (2H, m), 4.19 (1H, t, $J = 4.1$ Hz), 3.43 (2H, m), 3.10 (1H, dd, $J = 14.7$, 4.7 Hz), 3.00 (1H, ddd, $J = 12.0$, 9.7, 2.4 Hz), 2.22 (1H, dd, $J = 11.3$, 6.2 Hz), 1.85 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.53 (1H, qd, $J = 11.7$, 7.3 Hz), 1.22 (1H, m) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 171.8, 168.4, 138.1, 128.8, 126.4, 122.9, 120.2, 119.7, 112.5, 109.4, 59.6, 59.3, 46.2, 31.3, 29.9, 22.4 ppm; UPLC-MS (QToF-Premier): berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$: 284.1399, gefunden 284.1399.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[126] überein.

Cyclo-(L-Pro-L-Trp) (D4.2)

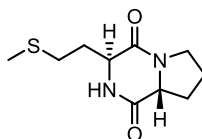
Farbloser Feststoff; 3.4 mg; $t_R = 3.64$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.33$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = -61.5$ ($c = 0.4$, EtOH); UV (analytische HPLC): λ_{max} 279, 220 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (1H, br. s.), 7.59 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.40 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J = 8.1$, 1.0 Hz), 7.16 (2H, m), 5.74 (1H, br. s.), 4.38 (1H, dd, $J = 10.7$, 2.5 Hz), 4.08 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 3.76 (1H, ddd, $J = 15.3$, 3.6, 1.0 Hz), 3.66 (1H, dt, $J = 12.2$, 8.1 Hz), 3.58 (1H, ddd, $J = 11.7$, 8.6, 3.0 Hz), 2.98 (1H, dd, $J = 15.3$, 10.7 Hz), 2.33 (1H, m), 2.02 (2H, m), 1.91 (1H, m) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$: 306.1218, gefunden 306.1220.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[39,126] überein.

Cyclo-(L-Pro-L-Val) (D5)

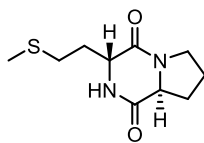
Farbloser Feststoff; 2.0 mg; $t_R = 2.72$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.31$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = -140$ ($c = 0.7$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.69 (1H, br. s.), 4.08 (1H, m), 3.94 (1H, s), 3.65 (1H, dt, $J = 11.7, 8.1$ Hz), 3.54 (1H, ddd, $J = 12.2, 9.2, 3.0$ Hz), 2.64 (1H, septd, $J = 7.0, 2.5$ Hz), 2.38 (1H, m), 2.06 (2H, m), 1.91 (1H, m), 1.06 (2H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$: 197.1290, gefunden 197.1290.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[126] überein.

Cyclo-(D-Pro-L-Met) (D6.1)

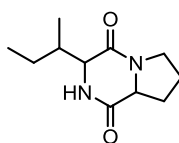
Farbloser Feststoff; 1.7 mg; $t_R = 2.30$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.34$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = +12.7$ ($c = 0.3$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.04 (1H, br. s.), 4.09 (2H, m), 3.68 (1H, m), 3.53 (1H, m), 2.66 (2H, m), 2.42 (1H, m), 2.17 (1H, m), 2.12 (3H, s), 2.05 (3H, m), 1.90 (1H, m) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{NaS}$: 251.0830, gefunden 251.0830.

Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[46,126] überein.

Cyclo-(L-Pro-D-Met) (D6.2)

Farbloser Feststoff; 1.8 mg; $t_R = 2.10$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.34$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = -10.7$ ($c = 0.3$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.18 (1H, br. s.), 4.21 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 4.11 (1H, m), 3.67 (1H, m), 3.53 (1H, m), 2.69 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.39 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.03 (3H, m), 1.91 (1H, m) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{NaS}$: 251.0830, gefunden 251.0830.

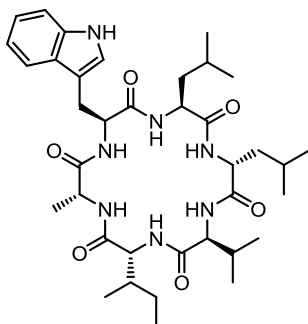
Der Drehwert und die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[46,126] überein.

Cyclo-(Pro-Ile) (D7)

Farbloser Feststoff; 3.8 mg; $t_R = 3.40$ min (analytische HPLC, Gradient C); $R_f = 0.26$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); $[\alpha]_D^{25} = +37.5$ ($c = 0.16$, EtOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.08 (1H, br. s.), 4.09 (1H, dd, $J = 9.7, 6.6$ Hz), 3.78 (1H, t, $J = 4.8$ Hz), 3.71 (1H, ddd, $J = 12.1, 8.3, 8.1$ Hz), 3.52 (1H, ddd, $J = 12.1, 9.0, 2.8$ Hz), 2.41 (1H, dt, $J = 12.2, 5.6$ Hz), 2.02 (1H, m), 1.92 (2H, m), 1.56 (2H, m), 1.24 (1H, m), 1.02 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.93 (3H, t, $J = 7.4$ Hz) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$: 211.1447, gefunden 211.1449.

6.2.2 Weitere Oligopeptide

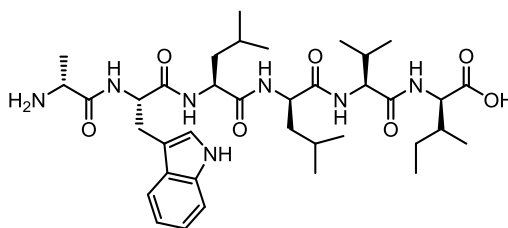
Baceridin (D8)



8.9 mg; $t_R = 17.87$ min (analytische HPLC); $R_f = 0.39$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); UV (analytische HPLC): λ_{max} 222, 281 nm; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.34 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.24 (1H, s), 7.10 (1H, m), 7.02 (1H, m), 4.59 (1H, m), 4.53 (1H, m), 4.42 (1H, dd, $J = 8.9, 4.3$ Hz), 4.37 (1H, dd, $J = 10.9, 4.1$ Hz), 4.31 (1H, d, $J = 3.8$ Hz), 4.04 (1H, d, $J = 9.4$ Hz), 3.36 (1H, br. s.), 3.17 (1H, dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz), 2.18 (1H, m), 1.95 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.57 (5H, m), 1.37 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.22 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.94 (15H, m), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.72 (3H, d, $J = 6.4$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 176.2, 175.8, 174.5, 174.3, 173.9, 173.4, 138.3, 128.66, 124.7, 122.8, 120.2, 119.3, 112.5, 110.5, 61.8, 58.6, 57.8, 53.0, 52.4, 50.2, 41.7, 40.5, 37.5, 30.8, 28.3, 27.6, 26.0, 25.8, 23.8, 23.3, 22.9, 21.4, 19.9, 19.7, 19.1, 14.7, 12.3 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{NaO}_6$: 718.4268, gefunden 718.4272.

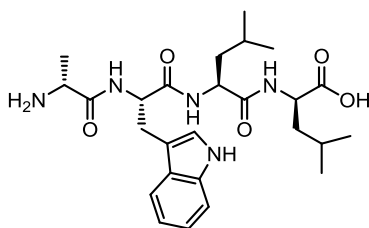
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 333 K, DMSO-d_6) δ 10.66 (1 H, s), 8.07 (1H, dd, $J = 8.4, 1.5$ Hz), 7.96 (1H, m), 7.84 (1H, t, $J = 6.6$ Hz), 7.62 (1H, dd, $J = 7.7, 4.0$ Hz), 7.54 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.37 (1H, d, $J = 6.2$ Hz), 7.34 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.24 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.07 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 6.99 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 4.41 (1H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.37 (1H, m), 4.29 (1H, quin, $J = 4.8$ Hz), 4.25 (2H, dq, $J = 8.8, 4.5$ Hz), 4.10 (1H, t, $J = 7.9$ Hz), 3.20 (1H, m), 2.98 (1H, m), 1.20 (1H, m), 1.93 (1H, m), 1.68 (1H, ddd, $J = 13.5, 8.8, 4.0$ Hz), 1.38 (8H, m), 1.11 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.92 (6H, m), 0.86 (15H, m), 0.80 (3H, d, $J = 6.6$ Hz) ppm.

Die spektroskopischen Daten in DMSO-d_6 stimmen mit den Literaturdaten^[143] überein.

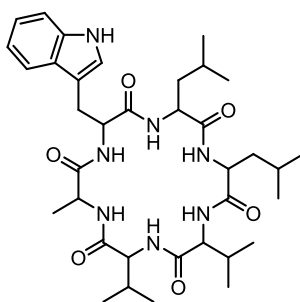
Azyklisches Baceridin (D9)

0.9 mg; $t_R = 17.87$ min (analytische HPLC); $R_f = 0.39$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 14:1); UV (analytische HPLC): λ_{max} 222, 281 nm; $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ 7.62 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.34 (1H, m), 7.21 (1H, s), 7.10 (1H, m), 7.03 (1H, m), 4.62 (1H, dd, $J = 9.6, 4.6$ Hz), 4.54 (1H, m), 4.36 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 4.33 (1H, dd, $J = 10.1, 4.9$ Hz), 4.10 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.33 (1H, m), 3.15 (1H, dd, $J = 15.0, 9.6$ Hz), 2.15 (1H, m), 1.99 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.51 (1H, m), 1.45 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.28 (3H, m), 1.19 (1H, m), 0.98 (3H, m), 0.96 (9H, m), 0.92 (6H, m), 0.88 (3H, m), 0.84 (3H, d, $J = 6.7$ Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ 178.9, 174.6, 174.5, 174.4, 173.2, 172.9, 138.3, 128.7, 124.8, 122.7, 120.1, 119.4, 112.5, 110.7, 61.7, 56.9, 53.5, 52.7, 50.5, 41.4, 41.0, 39.5, 31.3, 28.8, 28.2, 26.2, 26.0, 23.6, 23.5, 22.2, 21.9, 20.2, 19.1, 17.6, 15.6, 12.6 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{NaO}_6$: 718.4268, gefunden 718.4272.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[143] überein.

Tetrapeptid D10

8.3 mg; $t_R = 7.83$ min (ESI-HRMS); UV (analytische HPLC): λ_{\max} 222, 281 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.82 (1H, br. s.), 8.60 (1H, br. s.), 8.21 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.15 (1H, d, $J = 1.4$ Hz), 7.05 (1H, td, $J = 7.5, 0.8$ Hz), 6.97 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 4.52 (1H, m), 4.26 (1H, m), 4.01 (1H, m), 3.71 (1H, m), 3.14 (1H, m), 2.93 (1H, dd, $J = 14.5, 9.8$ Hz), 1.58 (2H, m), 1.47 (4H, m), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.86 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 0.83 (9H, m) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 174.1, 171.7, 170.7, 170.4, 136.0, 127.1, 123.8, 120.9, 118.3, 118.2, 111.3, 109.8, 54.2, 51.8, 51.1, 48.4, 41.3, 40.1, 27.7, 24.4, 24.3, 23.1, 21.9, 21.5, 17.6 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_5$: 502.3024, gefunden 502.3035.

Zyklisches Hexapeptid D11

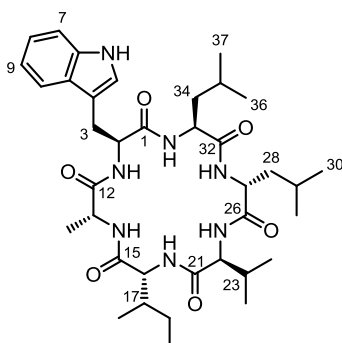
1.5 mg; t_R = 11.82 min (ESI-HRMS); UV (ESI-HRMS): λ_{\max} 222 nm; $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, DMSO-d_6) δ 10.84 (1H, s), 8.41 (1H, d, J = 9.0 Hz), 8.39 (1H, d, J = 6.2 Hz), 8.34 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.99 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.52 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.42 (1H, d, J = 5.6 Hz), 7.33 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.31 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.25 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.06 (1H, t, J = 7.5 Hz), 6.99 (1H, t, J = 7.3 Hz), 4.38 (1H, m), 4.35 (1H, m), 4.31 (1H, m), 4.15 (1H, m), 4.05 (1H, m), 4.01 (1H, m), 3.19 (1H, dd, J = 14.7, 3.3 Hz), 2.90 (1H, dd, J = 14.5, 10.4 Hz), 2.18 (1H, m), 1.85 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.49 (1H, m), 1.47 (1H, m), 1.46 (1H, m), 1.42 (2H, m), 1.02 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.89 (6H, m), 0.85 (15H, d, J = 8.0 Hz), 0.79 (3H, d, J = 6.5 Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}^{[198,199]}$ δ 128.4, 123.0, 120.4, 119.7, 117.9, 59.0, 58.2, 55.4, 50.7, 50.3, 48.6, 41.6, 39.0, 29.1, 28.2, 26.7, 25.0, 24.8, 22.6, 22.2, 22.1, 20.9, 18.9, 18.7, 16.7, 13.4 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_6$: 682.4287, gefunden 682.4292.

6.2.3 Synthese der Baceridinderivate

Allgemeine Vorschrift zur Zyklisierung der Hexapeptide:

Zu einer Lösung des ungereinigten Hexapeptids (1 eq) in CH_2Cl_2 , das aus der Festphasensynthese erhalten wurde, wurden $\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 eq), TBTU (1 eq) und Diisopropylethylamin (DIPEA, 2 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionsverlauf mit Hilfe von einer analytischen HPLC (Gradient B) überwacht. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC (Laufmittel A: 5% Acetonitril in H_2O + 0.1% Ameisensäure, vor Gebrauch filtriert; Laufmittel B: Acetonitril) aufgereinigt.

Hexapeptid Bac-1

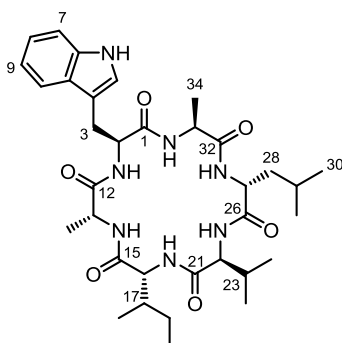


Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 5.0 mg (7 μ mol) ungereinigtem Hexapeptid, 6 mL CH_2Cl_2 , 1.1 mg (7 μ mol) $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 2.3 mg (7 μ mol) TBTU und 2.4 μL (14 μ mol) DIPEA mit 17 h Reaktionsdauer hergestellt. Eine RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 20% B zu 65% B in 25 min, von 65% B zu 100% B in 5 min, 100% B für 10 min, Flussrate: 6-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-1** als amorphen farblosen Feststoff in 34% Ausbeute (1.7 mg, 2.4 μ mol).

$t_{\text{R}} = 12.5$ min (ESI-HRMS); $R_{\text{f}} = 0.32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +15.0$ ($c = 0.1$, CHCl_3); UV (ESI-HRMS): λ_{max} 220, 280 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.84 (1H, d, $J = 1.8$ Hz; 5-NH), 8.35 (3H, dd, $J = 10.1, 6.8$ Hz; 2-NH; 16-NH; 22-NH), 8.04 (1H, d, $J = 8.8$ Hz; 33-NH), 7.52 (1H, d, $J = 7.9$ Hz; H10), 7.48 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, 13-NH), 7.33 (1H, d, $J = 8.1$ Hz; H7), 7.25 (1H, d, $J = 2.2$ Hz; H5), 7.21 (1H, d, $J = 7.7$ Hz; 27-NH), 7.06 (1H, m; H8), 6.99 (1H, m; H9), 4.37 (2H, m; H13; H27), 4.31 (1H, m; H33), 4.26 (1H, dd, $J = 8.9, 4.1$ Hz; H16), 4.15 (1H, ddd, $J = 10.0, 6.1, 3.7$ Hz; H2), 4.02 (1H, dd, $J = 9.7, 7.2$ Hz; H22), 3.18 (1H, dd, $J = 14.7, 3.3$ Hz; $\text{H}_{\text{a}}3$), 2.90 (1H, dd, $J = 14.6, 10.4$ Hz; $\text{H}_{\text{b}}3$), 1.99 (1H, m; H17), 1.83 (1H, m; H23), 1.64 (1H, ddd, $J = 13.6, 9.5, 3.9$ Hz; $\text{H}_{\text{a}}34$), 1.47 (3H, m; $\text{H}_{\text{a}}28$; H29; $\text{H}_{\text{b}}34$), 1.38 (2H, m; $\text{H}_{\text{b}}28$; H35), 1.27 (1H, m; $\text{H}_{\text{a}}19$), 1.17 (1H, m; $\text{H}_{\text{b}}19$), 1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; H14), 0.88 (6H, d, $J = 6.2$ Hz; H24; H30), 0.80 (18H, m; H18; H20; H25; H31; H36; H37) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.6 (C; C12), 172.4 (C; C21), 171.7 (C; C1), 171.3 (C; C15), 171.1 (C; C26), 170.8 (C; C32), 136.2 (C; C11), 127.0 (C; C6), 123.9 (CH; C5), 121.1 (CH; C8), 118.5 (CH; C9), 118.0 (CH; C10), 111.5 (CH; C7), 110.1 (C; C4), 59.7 (CH; C22), 56.0 (CH; C2), 55.6 (CH; C16), 51.0 (CH; C27), 50.6 (CH; C33), 49.3 (CH; C13), 42.2 (CH_2 ; C28), 39.3 (CH_2 ; C34), 36.0 (CH; C17), 28.6 (CH_2 ; C19; C23), 27.1 (CH_2 ;

C3), 24.5 (CH; C35), 24.3 (CH; C29), 23.3 (CH₃; C25), 22.9 (CH₃; C31), 22.6 (CH₃; C24), 21.2 (CH₃; C37), 19.4 (CH₃; C30), 19.1 (CH₃;C14), 18.9 (CH₃; C18), 14.4 (CH₃; C36), 11.7 (CH₃; C20) ppm; ESI-HRMS: berechnet für C₃₇H₅₈N₇O₆: 696.4443, gefunden 696.4444.

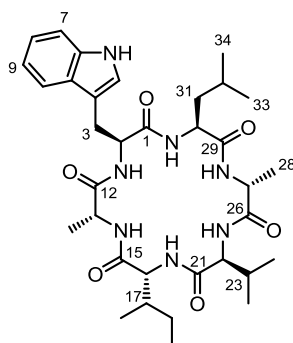
Hexapeptid Bac-2



Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 6.7 mg (10 μ mol) ungereinigtem Hexapeptid, 8.6 mL CH_2Cl_2 , 1.5 mg (10 μ mol) $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 3.2 mg (10 μ mol) TBTU und 3.4 μ L (20 μ mol) DIPEA mit 17 h Reaktionsdauer hergestellt. RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 50% B zu 100% B in 10 min, 100% B für 4 min, Flussrate: 8-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-2** als amorphen farblosen Feststoff in 34% Ausbeute (2.2 mg, 3.4 μ mol).

t_R = 11.3 min (ESI-HRMS); R_f = 0.28 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_D^{25} = +16.0$ (c = 0.1, CHCl_3); UV (ESI-HRMS): λ_{max} 220, 280 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.83 (1H, d, J = 2.0 Hz; 5-NH), 8.30 (2H, m; 16-NH; 22-NH), 8.25 (1H, d, J = 5.9 Hz; 2-NH), 8.05 (1H, d, J = 8.3 Hz; 33-NH), 7.50 (2H, m; H10; 13-NH), 7.32 (1H, d, J = 8.1 Hz; H7), 7.24 (1H, d, J = 2.2 Hz; H5), 7.19 (1H, d, J = 8.1 Hz; 27-NH), 7.06 (1H, m; H8), 6.98 (1H, m; H9), 4.37 (2H, m; H13; H27), 4.25 (2H, m; H16; H33), 4.13 (1H, m; H2), 4.02 (1H, dd, J = 9.4, 7.2 Hz; H22), 3.18 (1H, m; H_a3), 2.94 (1H, dd, J = 14.7, 9.7 Hz; H_b3), 1.99 (1H, m; H17), 1.85 (1H, m; H23), 1.45 (2H, m; H_a28 ; H29), 1.38 (1H, m; H_b28), 1.17 (2H, m; H19), 1.10 (3H, d, J = 7.2 Hz; H34), 1.06 (3H, d, J = 6.6 Hz; H14), 0.88 (6H, d, J = 6.4 Hz; H24; H30), 0.81 (12H, m, H18; H20; H25; H31) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.7 (C; C12), 172.3 (C; C21), 171.3 (C; C15), 171.2 (C; C32), 171.1 (C; C26), 136.2 (C; C11), 127.1 (C; C6), 123.9 (CH; C5), 121.1 (CH; C8), 118.5 (CH; C9), 118.1 (CH; C10), 111.5 (CH; C7), 110.0 (C; C4), 59.6 (CH; C22), 55.7 (CH; C2), 55.6 (CH; C16), 51.0 (CH; C27), 49.2 (CH_2 ; C3), 48.0 (CH; C33), 42.0 (CH_2 ; C28), 36.1 (CH; C17), 28.6 (CH; C23), 26.9 (CH_2 ; C3), 26.0 (CH_2 ; C19), 24.4 (CH; C29), 22.9 (CH_3 ; C31), 22.6 (CH_3 ; C30), 19.3 (CH_3 ; C24), 18.9 (CH_3 ; C20; C25; C14), 16.9 (CH_3 ; C34), 14.4 (CH_3 ; C18) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_6$: 654.3974, gefunden 654.3980.

Hexapeptid Bac-3

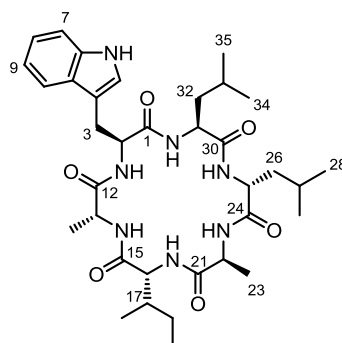


Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 5.0 mg (7.4 μmol) ungereinigtem Hexapeptid, 6.4 mL CH_2Cl_2 , 1.1 mg (7.4 μmol) HOBt $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 2.4 mg (7.4 μmol) TBTU und 2.5 μL (14.8 μmol) DIPEA mit 16.5 h Reaktionsdauer hergestellt. Eine RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 50% B zu 100% B in 10 min, 100% B für 4 min, Flussrate: 8-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-3** als amorphen farblosen Feststoff in 21% Ausbeute (1.0 mg, 1.5 μmol).

t_{R} = 11.0 min (ESI-HRMS); R_{f} = 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = +9.0 (c = 0.08, CHCl_3); UV (ESI-HRMS): λ_{max} 220, 280 nm; $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, DMSO-d_6) δ 10.84 (1H, d, J = 1.7 Hz; 5-NH), 8.42 (1H, d, J = 8.8 Hz; 16-NH), 8.37 (1H, d, J = 6.5 Hz; 12-NH), 8.28 (1H, d, J = 6.9 Hz; 22-NH), 8.17 (1H, d, J = 8.8 Hz; 30-NH), 7.53 (1H, d, J = 8.0 Hz; H10), 7.48 (1H, d, J = 5.2 Hz; 13-NH), 7.33 (1H, d, J = 8.2 Hz; H7), 7.26 (1H, d, J = 2.2 Hz; H5), 7.23 (1H, d, J = 6.7 Hz; 27-NH), 7.06 (1H, m; H8), 6.99 (1H, m; H9), 4.32 (3H, m; H13; H27; H30), 4.26 (1H, dd, J = 9.0, 4.1 Hz; H16), 4.17 (1H, ddd, J = 10.4, 6.6, 3.4 Hz; H2), 3.99 (1H, dd, J = 9.7, 6.9 Hz; H22), 3.19 (1H, dd, J = 14.6, 3.2 Hz; $\text{H}_{\text{a}3}$), 2.88 (1H, dd, J = 14.6, 10.5 Hz; $\text{H}_{\text{b}3}$), 1.97 (3H, m; H17; H19), 1.80 (1H, m; H23), 1.68 (1H, ddd, J = 13.9, 10.3, 3.6 Hz; $\text{H}_{\text{a}31}$), 1.50 (1H, m; $\text{H}_{\text{b}31}$), 1.45 (1H, m), 1.39 (1H, m; H32), 1.17 (3H, d, J = 6.7 Hz; H28), 1.02 (3H, d, J = 6.5 Hz; H14), 0.91 (3H, d, J = 6.7 Hz; H24), 0.81 (15H, m; H18; H20; H25; H33; H34) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, DMSO-d_6) δ 172.6 (C; C21), 172.4 (C; C12), 171.9 (C; C1), 171.7 (C; C26), 171.4 (C; C15), 170.9 (C; C29), 136.2 (C; C11), 127.0 (C; C6), 124.0 (CH; C5), 121.1 (CH; C8), 118.5 (CH; C9), 118.0 (CH; C10), 111.6 (CH; C7), 110.2 (C; C4), 59.8 (CH; C22), 55.9 (CH; C2), 55.6 (CH; C16), 50.5 (CH; C30), 49.5 (CH; C13), 48.1 (CH; C27), 40.2 (CH_2 ; C31), 36.1, 28.7 (CH; C23), 27.2 (CH_2 ; C3), 26.7 (CH; C17; C19), 24.3 (CH; C32), 23.5 (CH_3 ; C25), 21.1 (CH_3 ; C33), 19.6 (CH_3 ; C24), 19.4 (CH_3 ; C28), 19.1 (CH_3 ;

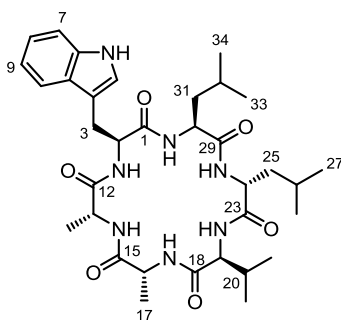
C14), 18.9 (CH₃; C18), 14.5 (CH₃; C20), 11.7 (CH₃; C34) ppm; ESI-HRMS: berechnet für C₃₄H₅₂N₇O₆: 654.3974, gefunden 654.3982.

Hexapeptid Bac-4



Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 6.9 mg (10 μ mol) ungereinigtem Hexapeptid, 8.6 mL CH_2Cl_2 , 1.5 mg (10 μ mol) $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 3.2 mg (10 μ mol) TBTU und 3.4 μ L (20 μ mol) DIPEA mit 17 h Reaktionsdauer hergestellt. RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 50% B zu 100% B in 10 min, 100% B für 4 min, Flussrate: 8-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-4** als amorphen farblosen Feststoff in 30% Ausbeute (2.0 mg, 3.0 μ mol).

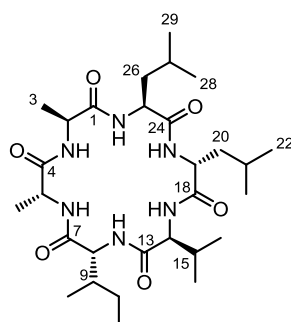
t_R = 11.2 min (ESI-HRMS); R_f = 0.26 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_D^{25} = +24.0$ (c = 0.1, CHCl_3); UV (ESI-HRMS): λ_{max} 220, 280 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.84 (1H, d, J = 2.0 Hz; 5-NH), 8.32 (1H, d, J = 6.2 Hz; 2-NH), 8.19 (2H, m; 16-NH; 22-NH), 7.94 (1H, d, J = 8.3 Hz; 31-NH), 7.52 (1H, d, J = 7.9 Hz; H10), 7.46 (2H, m; 13-NH; 25-H), 7.33 (1H, d, J = 8.1 Hz; H7), 7.22 (1H, d, J = 2.2 Hz; H5), 7.06 (1H, m; H8), 6.98 (1H, m; H9), 4.35 (1H, m; H22), 4.32 (1H, m; H25), 4.29 (2H, m; H13; H31), 4.20 (1H, m; H2), 4.17 (1H, m, H16), 3.21 (1H, m; H_a3), 2.92 (1H, m; H_b3), 1.96 (H, m; H17), 1.62 (1H, m; H_a32), 1.52 (4H, m; H26; H27; H_b32), 1.34 (1H, m; H33), 1.22 (1H, m; H_a19), 1.14 (1H, m; H_b19), 1.12 (3H, d, J = 7.0 Hz; H23), 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz; H14), 0.82 (18H, m; H18; H20; H28; H29; H34; H35) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.9 (C; C12), 172.8 (C; C21), 171.6 (C; C1), 171.6 (C; C24), 171.1 (C; C30), 171.0 (C; C15), 136.2 (C; C11), 127.1 (C; C6), 123.8 (CH; C5), 121.1 (CH; C8), 118.5 (CH; C9), 118.1 (CH; C10), 111.5 (CH; C7), 110.1 (C; C4), 55.9 (CH; C16), 55.6 (CH; C2), 51.0 (CH; C31), 50.8 (CH; C25), 49.3 (CH; C13), 48.5 (CH; C22), 41.5 (CH_2 ; H26), 39.1 (CH_2 ; C32), 36.0 (CH; C17), 27.2 (CH_2 ; C3), 25.8 (CH_3 ; C19), 24.4 (CH; C33), 24.3 (CH; C27), 23.1 (CH_3 ; C28), 22.1 (CH_3 ; C29), 22.1 (CH_3 ; C35), 21.5 (CH_3 ; C34), 18.6 (CH_3 ; C14), 16.6 (CH_3 ; C23), 14.4 (CH_3 ; C18), 11.6 (CH_3 ; C20) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_6$: 668.4130, gefunden 668.4140.

Hexapeptid **Bac-5**

Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 5.0 mg (7.4 μmol) ungereinigtem Hexapeptid, 6.4 mL CH_2Cl_2 , 1.1 mg (7.4 μmol) $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 2.4 mg (7.4 μmol) TBTU und 2.5 μL (14.8 μmol) DIPEA mit 16.5 h Reaktionsdauer hergestellt. RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 50% B zu 100% B in 10 min, 100% B für 4 min, Flussrate: 8-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-5** als amorphen farblosen Feststoff in 33% Ausbeute (1.6 mg, 2.4 μmol).

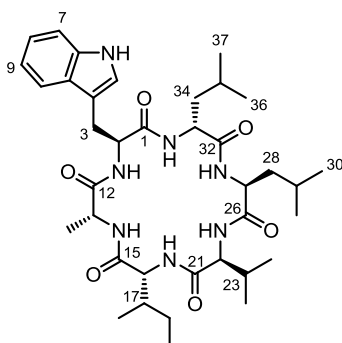
t_R = 10.8 min (ESI-HRMS); R_f = 0.25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_D^{25}$ = +14.0 (c = 0.1, CHCl_3); UV (ESI-HRMS): λ_{max} 220, 280 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.84 (1H, d, J = 2.0 Hz; 5-NH), 8.62 (1H, d, J = 7.3 Hz; 16-NH), 8.30 (1H, d, J = 6.2 Hz; 2-NH), 8.21 (1H, d, J = 7.3 Hz; 19-NH), 7.95 (1H, d, J = 8.4 Hz; 13-NH), 7.52 (1H, d, J = 7.9 Hz; H10), 7.36 (2H, m; 24-NH; 30-NH), 7.33 (1H, d, J = 8.1 Hz; H7), 7.23 (1H, d, J = 2.4 Hz; H5), 7.06 (1H, m; H8), 6.98 (1H, m; H9), 4.38 (1H, m; H24), 4.28 (2H, m; H13; H30), 4.17 (1H, m; H2), 4.10 (1H, m; H16), 3.83 (1H, dd, J = 9.0, 7.5 Hz; H19), 3.20 (1H, m; H_a3), 2.92 (1H, m; H_b3), 1.89 (1H, m; H20), 1.62 (1H, m; H_a31), 1.50 (1H, m; H_b31), 1.46 (3H, m; H25; H26), 1.37 (1H, m; H32), 1.20 (3H, d, J = 7.5 Hz; H17), 1.03 (3H, d, J = 6.8 Hz; H14), 0.86 (15H, m; H21; H22; H27; H28; H33), 0.76 (3H, d, J = 6.6 Hz; H34) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.9 (C; C12), 172.2 (C; C15), 171.6 (C; C1), 171.5 (C; C23), 171.2 (C; C18), 171.0 (C; C29), 136.2 (C; C11), 127.0 (C; C6), 123.8 (CH; C5), 121.1 (CH; C8), 118.5 (CH; C9), 118.1 (CH; C10), 111.5 (CH; C7), 110.1 (C; C4), 59.6 (CH; C19), 55.9 (CH; C2), 51.1 (CH; C24), 50.8 (CH; C30), 49.0 (CH; C13), 48.9 (CH; C16), 41.6 (CH_2 ; C25), 39.9 (CH_2 ; C31), 28.8 (CH; C20), 27.1 (CH_2 ; C3), 24.4 (CH; C26), 24.3 (CH; C32), 23.2 (CH_3 ; C28), 22.7 (CH_3 ; C27), 22.6 (CH_3 ; C33), 21.4 (CH_3 ; H34), 19.1 (CH_3 ; C22), 19.0 (CH_3 ; C21), 18.7 (CH_3 ; C14), 17.9 (CH_3 ; C17) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_6$: 654.3974, gefunden 654.3979.

Hexapeptid Bac-6



Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 9.0 mg (15 μ mol) ungereinigtem Hexapeptid, 12.5 mL CH_2Cl_2 und 0.5 mL DMF zur Verbesserung der Löslichkeit, 2.3 mg (15 μ mol) $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 4.8 mg (15 μ mol) TBTU und 5.1 μ L (30 μ mol) DIPEA mit 17.5 h Reaktionsdauer hergestellt. RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 50% B zu 100% B in 10 min, 100% B für 4 min, Flussrate: 8-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-6** als amorphen farblosen Feststoff in 35% Ausbeute (3.1 mg, 5.3 μ mol).

t_R = 10.7 min (ESI-HRMS); R_f = 0.26 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_D^{25} = +17.0$ (c = 0.09, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.42 (1H, d, J = 4.3 Hz), 8.39 (1H, d, J = 7.2 Hz), 8.36 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.98 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.54 (1H, d, J = 6.0 Hz), 7.22 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.41 (2H, m), 4.28 (1H, dd, J = 9.0, 4.1 Hz), 4.24 (1H, m), 4.05 (1H, dd, J = 9.9, 7.2 Hz), 3.84 (1H, m), 2.03 (1H, m), 1.85 (1H, m), 1.66 (1H, ddd, J = 13.7, 9.9, 3.8 Hz), 1.48 (5H, m), 1.36 (1H, dd, J = 12.0, 6.6 Hz), 1.23 (6H, m), 1.18 (1H, d, J = 7.0 Hz), 0.89 (6H, d, J = 5.6 Hz), 0.83 (15H, m), 0.77 (3H, d, J = 6.7 Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 172.8, 172.6, 172.5, 171.2, 171.0, 171.0, 59.8, 55.5, 51.1, 50.4, 49.1, 42.2, 36.2, 28.5, 26.0, 24.5, 24.5, 23.3, 23.1, 22.4, 21.0, 19.5, 19.4, 18.9, 17.5, 14.4, 11.8 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_6$: 581.4021, gefunden 581.4024.

Hexapeptid **Bac-7**

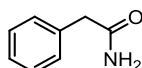
Das Produkt wurde über die Vorschrift zur Zyklisierung von Hexapeptiden unter Verwendung von 7.1 mg (10 μ mol) ungereinigtem Hexapeptid, 8.6 mL CH_2Cl_2 , 1.5 mg (10 μ mol) $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 3.2 mg (10 μ mol) TBTU und 3.4 μ L (20 μ mol) DIPEA mit 17 h Reaktionsdauer hergestellt. Eine RP-HPLC Reinigung (Gradient: von 50% B zu 100% B in 10 min, 100% B für 4 min, Flussrate: 8-10 mL min^{-1}) führte zum zyklischen Hexapeptid **Bac-7** als amorphen farblosen Feststoff in 27% Ausbeute (1.9 mg, 2.7 μ mol).

t_R = 12.5 min (ESI-HRMS); R_f = 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); $[\alpha]_D^{25} = -7.0$ (c = 0.07, CHCl_3); UV (ESI-HRMS): λ_{max} 220, 280 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.80 (1H, d, J = 1.8 Hz; 5-NH), 8.39 (1H, d, J = 8.4 Hz; 27-NH), 8.09 (1H, d, J = 6.1 Hz; 16-NH), 8.04 (1H, d, J = 7.5 Hz; 33-NH), 7.96 (1H, d, J = 7.7 Hz; 13-NH), 7.72 (1H, d, J = 7.7 Hz; 2-NH), 7.52 (1H, d, J = 7.9 Hz; H10), 7.30 (2H, dd, J = 7.7, 2.6 Hz; H7; 22-NH), 7.08 (1H, d, J = 2.2 Hz; H5), 7.04 (1H, m; H8), 6.95 (1H, m), 4.46 (1H, q, J = 7.3 Hz; H2), 4.41 (1H, t, J = 6.9 Hz; H22), 4.25 (1H, t, J = 7.3 Hz; H13), 4.16 (2H, m; H27; H33), 3.99 (1H, dd, J = 6.0, 4.5 Hz; H16), 3.13 (1H, m; H_a3), 2.98 (1H, dd, J = 14.6, 7.2 Hz; H_b3), 1.97 (2H, m; H9; H23), 1.90 (1H, m; H17), 1.55 (1H, m; H29), 1.48 (2H, m; H28), 1.36 (2H, m; H34), 1.28 (3H, m; H19; H35), 1.20 (3H, d, J = 7.0 Hz; H14), 0.83 (24H, m; H18; H20; H24; H25; H30; H31; H36), 0.71 (3H, d, J = 6.2 Hz; H37) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.2 (C; C26), 172.0 (C; C21), 171.4 (CH_3 ; C32), 171.3 (C; C12), 171.0 (C; C15), 170.8 (C; C1), 136.1 (C; C11), 127.4 (C; C6), 123.7 (CH; C5), 120.9 (CH; C8), 118.4 (CH; C9), 118.3 (CH; C10), 111.3 (CH; C7), 109.8 (C; C4), 57.9 (CH; C16), 57.5 (CH; C22), 53.7 (CH; C2), 52.0 (CH; C27), 51.3 (CH; C33), 48.4 (CH; C13), 41.0 (CH_2 ; C28), 39.7 (CH_2 ; C34), 35.9 (CH; C17), 31.2 (CH; C23), 28.8 (CH_2 ; C19), 27.5 (CH_2 ; C3), 24.1 (CH; C35), 22.6 (CH_3 ; C25), 22.2 (CH_3 ; C31), 22.2 (CH_3 ; C37), 21.2 (CH_3 ; C30), 18.8 (CH_3 ; C24), 18.6 (CH_3 ; C18), 17.4

(CH₃; C14), 14.6 (CH₃; C36), 11.7 (CH₃; C20) ppm; ESI-HRMS: berechnet für C₃₇H₅₈N₇O₆: 696.4443, gefunden 696.4450.

6.2.4 Weitere Sekundärmetabolite aus *B. cereus* und *M. pulcherrima*

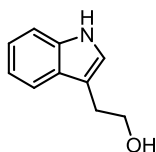
2-Phenylacetamid (D12)



Farbloser Feststoff; 2.0 mg; t_R = 4.21 min (analytische HPLC, Gradient C); R_f = 0.31 (CH₂Cl₂/MeOH 14:1); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (5H, m), 5.35 (2H, br. s.), 3.60 (2H, s); ESI-HRMS: berechnet für C₈H₁₀NO: 136.0762, gefunden 136.0765.

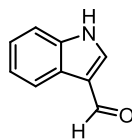
Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[200] überein.

Tryptophol (D13)



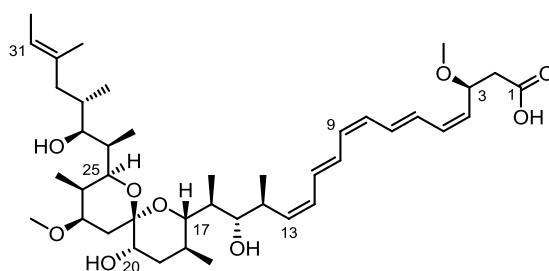
8.0 mg; t_R = 8.11 min (ESI-HRMS); UV (ESI-HRMS): λ_{\max} 280, 221 nm; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.53 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.32 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.07 (2H, m), 6.99 (1H, m), 3.81 (2H, d, J = 7.1 Hz), 2.97 (2H, t, J = 7.6 Hz) ppm; ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 138.3, 129.1, 123.7, 122.3, 119.6, 119.4, 112.9, 112.3, 63.8, 30.0 ppm; ESI-HRMS: gefunden 162.0913.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[156] überein.

1H-Indol-3-carbaldehyd (D14)

4.0 mg; $t_R = 4.71$ min (ESI-HRMS); UV (Methanol, ESI-MS): λ_{\max} 208, 244, 260, 300 nm; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 9.89 (1H, s), 8.16 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.10 (1H, s), 7.48 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.28 (1H, m), 7.24 (1H, m) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 187.5, 139.8, 139.1, 125.9, 125.1, 123.8, 122.5, 120.3, 113.3 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}$: 146.0600, gefunden 146.0611.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[163] überein.

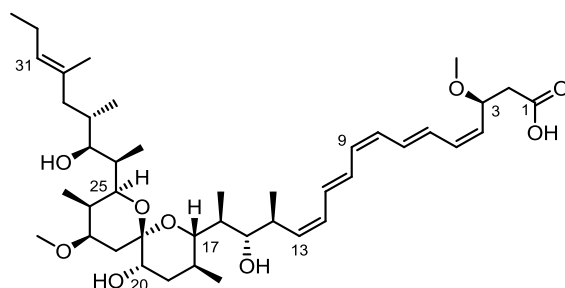
6.2.5 Spirangienderivate**Spirangien A (S1)**

Hellgelbes Öl; 70.5 mg; $t_R = 16.0$ min (ESI-HRMS), Gradient ; $R_f = 0.44$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} = -29.0$ ($c = 1.0$, MeOH); UV (Methanol): λ_{\max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.74), 333 (4.79), 317 (4.61), 304 nm (4.30); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.86 (1H, dd, $J = 14.4$, 11.4 Hz; H7), 6.79 (1H, dd, $J = 14.4$, 11.4 Hz; H10), 6.66 (1H, dd, $J = 14.3$, 11.7 Hz; H6), 6.60 (1H, dd, $J = 14.4$, 11.6 Hz; H11), 6.37 (1H, t, $J = 11.2$ Hz; H5), 6.18 (1H, m; H12), 6.16 (1H, m; H9), 6.11 (1H, t, $J = 11.2$ Hz; H8), 5.64 (1H, t, $J = 10.6$ Hz; H13), 5.30 (1H, t, $J = 10.1$ Hz; H4), 5.22 (1H, q, $J = 6.5$ Hz; H31), 4.62 (1H, td, $J = 8.6$, 5.4 Hz; H3), 3.69 (1H, dd, $J = 10.3$, 1.7 Hz; H25), 3.65 (1H, m; H27), 3.64 (1H, m; H23), 3.59 (1H, dd, $J = 10.4$, 0.8 Hz; H17), 3.56 (1H, dd, $J = 9.8$, 2.3 Hz; H15), 3.39 (1H, t, $J = 2.8$ Hz; H20), 3.34 (3H, s; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.96 (1H, dqd, $J = 10.3$, 6.8, 2.8 Hz; H14), 2.67 (1H, d, $J = 13.1$ Hz; H_a29), 2.56 (1H, dd, $J = 14.6$, 8.0 Hz; H_a2),

2.41 (1H, dd, $J = 15.2, 5.1$ Hz; H_b2), 2.12 (1H, qdd, $J = 6.5, 4.3, 1.8$ Hz; H₂₄), 2.03 (1H, dd, $J = 13.1, 4.7$ Hz; H_a22), 1.92 (1H, m; H₁₈), 1.83 (1H, dqd, $J = 10.5, 6.9, 0.8$ Hz; H₂₆), 1.73 (2H, m; H_a19; H₂₈), 1.67 (1H, dt, $J = 13.2, 3.6$ Hz; H_b19), 1.60 (8H, m; H₁₆; H_b29; H₃₂; 30-Me), 1.37 (1H, t, $J = 12.5$ Hz; H_b22), 1.12 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 14-Me), 0.81 (3H, d, $J = 7.1$ Hz; H₂₆-Me), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 24-Me), 0.75 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 18-Me), 0.71 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 28-Me) ppm; ¹³C-NMR (176 MHz, CD₃OD) $\delta = 174.7$ (C; C₁), 136.1 (C; C₃₀), 134.8 (CH; C₁₃), 134.0 (CH; C₅), 132.3 (CH; C₉), 132.1 (CH; C₇), 131.4 (CH; C₄), 131.0 (CH; C₁₁), 130.4 (CH; C₈), 130.2 (CH; C₁₂), 129.7 (CH; C₁₀), 129.2 (CH; C₆), 121.3 (CH; C₃₁), 99.6 (C; C₂₁), 78.9 (CH; C₂₃), 76.7 (CH; C₁₅), 76.3 (CH; C₂₇), 75.3 (CH; C₁₇), 74.9 (CH; C₃), 72.6 (CH; C₂₅), 71.2 (CH; C₂₀), 56.7 (CH₃; 3-OMe), 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.2 (CH₂; C₂₉), 42.1 (CH₂; C₂), 40.2 (CH; C₁₆), 37.9 (CH; C₂₆), 37.5 (CH₂; C₁₉), 36.3 (CH; C₁₄), 35.5 (CH; C₂₈), 34.1 (CH₂; C₂₂), 33.0 (CH; C₂₄), 25.8 (CH; C₁₈), 19.8 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.0 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C₃₂), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.2 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für C₄₁H₆₆NaO₉: 725.4599, gefunden 725.4607.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[95] überein.

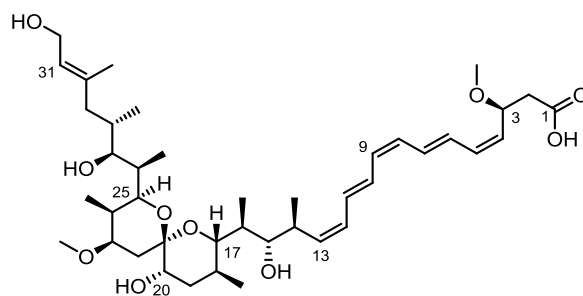
Spirangien B (S2)



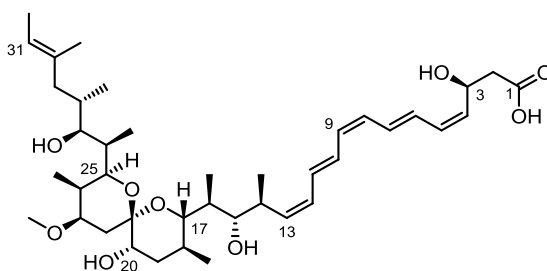
Hellgelbes Öl; 7.4 mg; $t_R = 16.7$ min (ESI-HRMS); $R_f = 0.37$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); $[\alpha]_D^{25} = -14.0$ ($c = 0.1$, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.65), 333 (4.69), 317 (4.51), 304 nm (4.20); ¹H-NMR (700 MHz, CD₃OD) $\delta = 6.86$ (1H, dd, $J = 14.4, 11.4$ Hz; H₇), 6.79 (1H, dd, $J = 14.4, 11.6$ Hz; H₁₀), 6.65 (1H, dd, $J = 14.3, 11.7$ Hz; H₆), 6.60 (1H, dd, $J = 14.3, 11.5$ Hz; H₁₁), 6.37 (1H, t, $J = 11.3$ Hz; H₅), 6.18 (1H, m; H₁₂), 6.15 (1H, m; H₉), 6.11 (1H, t, $J = 11.0$ Hz; H₈), 5.64 (1H, t, $J = 10.6$ Hz; H₁₃), 5.30 (1H, t, $J = 10.2$ Hz; H₄), 5.15 (1H, t, $J = 7.1$ Hz; H₃₁), 4.62 (1H, td, $J = 8.6, 5.4$ Hz; H₃), 3.69 (1H, dd, $J = 10.1, 1.7$ Hz; H₂₅), 3.65 (1H, m; H₂₇), 3.63 (1H, m; H₂₃), 3.60

(1H, dd, $J = 10.5, 0.9$ Hz; H17), 3.56 (1H, dd, $J = 9.7, 2.2$ Hz; H15), 3.39 (1H, m; H20), 3.34 (3H, m; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.95 (1H, dqd, $J = 9.5, 7.1, 2.6$ Hz; H14), 2.68 (1H, d, $J = 12.9$ Hz; H_a29), 2.56 (1H, dd, $J = 15.2, 8.3$ Hz; H_a2), 2.41 (1H, dd, $J = 15.2, 5.3$ Hz; H_b2), 2.12 (1H, m; H24), 2.04 (2H, m; H32), 2.02 (1H, m; H_a22), 1.92 (1H, m; H18), 1.83 (1H, dqd, $J = 9.9, 6.9, 0.9$ Hz; H26), 1.75 (1H, m; H_a19), 1.72 (1H, m; H28), 1.67 (1H, dt, $J = 13.3, 3.6$ Hz; H_b19), 1.62 (4H, m; H16; 30-Me), 1.57 (1H, dd, $J = 13.1, 10.5$ Hz; H_b29), 1.37 (1H, t, $J = 12.6$ Hz; H_b22), 1.12 (3H, d, $J = 6.9$ Hz; 14-Me), 0.96 (3H, t, $J = 7.5$ Hz; H33), 0.81 (3H, d, $J = 7.1$ Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, $J = 6.9$ Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, $J = 6.9$ Hz; 24-Me), 0.76 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 18-Me), 0.72 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 28-Me) ppm; ^{13}C -NMR (176 MHz, CD₃OD) $\delta = 174.6$ (C; C1), 134.8 (CH; C13), 134.7 (C; C30), 134.0 (CH; C5), 132.3 (CH; C9), 132.1 (CH; C7), 131.4 (CH; C4), 131.1 (CH; C11), 130.4 (CH; C8), 130.2 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.5 (CH; C31), 129.2 (CH; C6), 99.6 (C; C21), 78.9 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.4 (CH; C27), 74.9 (CH; C3), 75.3 (CH; C17), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 56.7 (CH₃; 3-OMe), 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.2 (CH₂; C29), 42.0 (CH; C2), 40.2 (CH; C16), 38.0 (CH; C26), 37.5 (CH₂; C19), 36.3 (CH; C14), 35.4 (CH; C28), 34.1 (CH₂; C22), 33.10 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 22.3 (CH₂; C32), 19.7 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.1 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 14.9 (CH₃; C33), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.2 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für C₄₂H₆₈NaO₉: 739.4756, gefunden 739.4753.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturdaten^[95] überein.

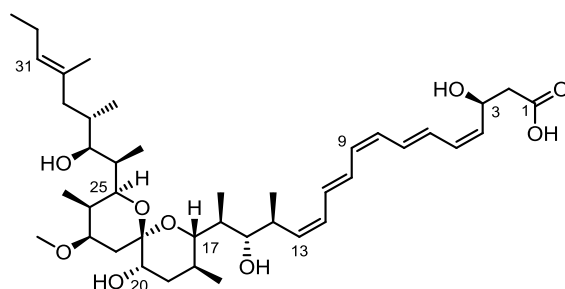
Spirangien G (S3)^[201]

Hellgelbes Öl; 1.5 mg; t_R = 12.8 min (ESI-HRMS); R_f = 0.23 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ = -8.4 (c = 0.5, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.42), 333 (4.47), 317 (4.31), 304 nm (4.04); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.85 (1H, dd, J = 14.4, 11.2 Hz; H7), 6.79 (1H, dd, J = 14.4, 11.2 Hz; H10), 6.67 (1H, m; H6), 6.60 (1H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz; H11), 6.36 (1H, t, J = 11.3 Hz; H5), 6.18 (1H, m; H12), 6.15 (1H, m; H9), 6.10 (1H, m; H8), 5.64 (1H, t, J = 10.6 Hz; H13), 5.37 (1H, t, J = 6.7 Hz; H31), 5.30 (1H, t, J = 10.0 Hz; H4), 4.63 (1H, m; H3), 4.12 (1H, dd, J = 12.2, 7.1 Hz; H_a32), 4.08 (1H, dd, J = 12.2, 7.1 Hz; H_b32), 3.69 (1H, dd, J = 10.2, 1.6 Hz; H25), 3.66 (1H, d, J = 9.7 Hz; H27), 3.63 (1H, m; H23), 3.60 (1H, d, J = 10.5 Hz; H17), 3.55 (1H, dd, J = 9.8, 2.3 Hz; H15), 3.39 (1H, t, J = 2.8 Hz; H20), 3.34 (2H, s; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.95 (1H, dqd, J = 10.3, 6.8, 2.8 Hz; H14), 2.70 (1H, d, J = 12.8 Hz; H_a29), 2.56 (1H, br. s.; H_a2), 2.39 (1H, m; H_b2), 2.12 (1H, m; H24), 2.03 (1H, dd, J = 13.0, 4.8 Hz; H_a22), 1.92 (1H, m; H18), 1.83 (1H, m; H26), 1.78 (1H, m; H28), 1.74 (1H, m; H_b19), 1.68 (4H, m; H_b29; 30-Me), 1.66 (1H, m; H_a19), 1.60 (3H, m; H16), 1.37 (1H, t, J = 12.5 Hz; H_b22), 1.12 (3H, d, J = 6.8 Hz; 14-Me), 0.82 (3H, d, J = 6.8 Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, J = 6.8 Hz; 16-Me), 0.78 (3H, d, J = 6.8 Hz; 24-Me), 0.76 (6H, dd, J = 6.7, 2.2 Hz; 18-Me; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 139.0 (C; C30), 134.7 (CH; C13), 133.9 (CH; C5), 132.3 (CH; C9), 132.0 (CH; C7), 131.7 (CH; C4), 131.0 (CH; C11), 130.5 (CH; C8), 130.2 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.4 (CH; C6), 126.8 (CH; C31), 99.7 (C; C21), 78.9 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.3 (CH; C27), 75.3 (CH; C17), 75.2 (CH; C3), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 59.6 (CH₂; C32), 56.7 (CH₃; 3-OMe), 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.3 (CH₂; C29), 40.3 (CH; C16), 39.8 (CH₂; C2)^[198], 38.0 (CH; C26), 37.5 (CH₂; C19), 36.3 (CH; C14), 35.5 (CH; C28), 34.2 (CH₂; C22), 33.1 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 19.8 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.4 (CH₃; 30-Me), 16.0 (CH₃; 28-Me), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.3 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{NaO}_{10}$: 741.4548, gefunden 741.4550.

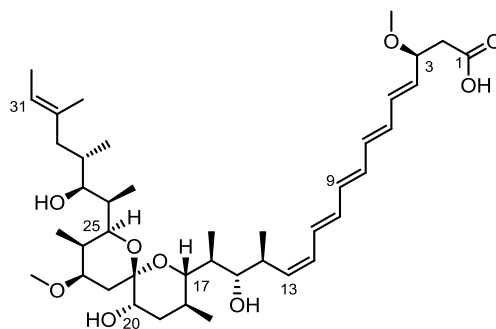
Spirangien H (S4)

Hellgelbes Öl; 7.7 mg; t_R = 14.8 min (ESI-HRMS); R_f = 0.16 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} = -11.0$ ($c = 1.0$, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.66), 332 (4.71), 317 (4.54), 304 nm (4.26); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.82 (1H, dd, $J = 14.4$, 11.2 Hz; H7), 6.78 (1H, dd, $J = 14.6$, 11.2 Hz; H10), 6.63 (1H, dd, $J = 14.2$, 11.4 Hz; H6), 6.59 (1H, dd, $J = 14.4$, 11.6 Hz; H11), 6.19 (1H, m; H5), 6.18 (1H, m; H12), 6.14 (1H, m; H9), 6.09 (1H, t, $J = 11.0$ Hz; H8), 5.64 (1H, t, $J = 10.6$ Hz; H13), 5.45 (1H, t, $J = 9.8$ Hz; H4), 5.22 (1H, q, $J = 6.5$ Hz; H31), 5.02 (1H, q, $J = 6.7$ Hz; H3), 3.69 (1H, dd, $J = 10.1$, 1.7 Hz; H25), 3.65 (1H, dd, $J = 9.2$, 0.8 Hz; H27), 3.64 (1H, m; H23), 3.59 (1H, dd, $J = 10.5$, 0.8 Hz; H17), 3.56 (1H, dd, $J = 9.9$, 2.2 Hz; H15), 3.39 (1H, t, $J = 2.8$ Hz; H20), 3.34 (3H, s; H23-OMe), 2.95 (1H, dqd, $J = 9.0$, 6.9, 1.8 Hz; H14), 2.67 (1H, d, $J = 13.3$ Hz; H_a29), 2.55 (1H, dd, $J = 15.1$, 8.0 Hz; H_a2), 2.43 (1H, dd, $J = 15.1$, 5.6 Hz; H_b2), 2.12 (1H, qdd, $J = 6.5$, 4.7, 1.5 Hz; H24), 2.02 (1H, dd, $J = 13.0$, 4.6 Hz; H_a22), 1.92 (1H, m; H18), 1.83 (1H, dqd, $J = 9.9$, 7.1, 1.1 Hz; H26), 1.73 (2H, m; H_a19; H28), 1.67 (1H, dt, $J = 13.3$, 3.6 Hz; H_b19), 1.60 (8H, m; H16; H_b29; H32; 30-Me), 1.37 (1H, t, $J = 12.5$ Hz; H_b22), 1.11 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 14-Me), 0.81 (3H, d, $J = 7.1$ Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 24-Me), 0.75 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 18-Me), 0.71 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 174.8 (C; C1), 136.1 (C; C30), 134.7 (CH; C13), 134.0 (CH; C4), 132.0 (CH; C9), 131.5 (CH; C7), 131.3 (CH; C5), 130.9 (CH; C11), 130.6 (CH; C8), 130.2 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.6 (CH; C6), 121.3 (CH; C31), 99.6 (C; C21), 78.9 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.3 (CH; C27), 75.3 (CH; C17), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 65.8 (CH₃; C3), 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.2 (CH₂; C29), 43.7 (CH₂; C2), 40.2 (CH; C16), 37.9 (CH; C26), 37.5 (CH₂; C19), 36.2 (CH; C14), 35.5 (CH; C28), 34.1 (CH₂; C22), 33.0 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 19.7 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.0 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C32), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.2 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{NaO}_9$: 711.4442, gefunden 711.4436.

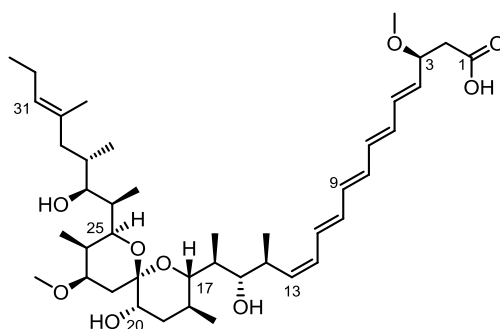
Spirangien I (S5)



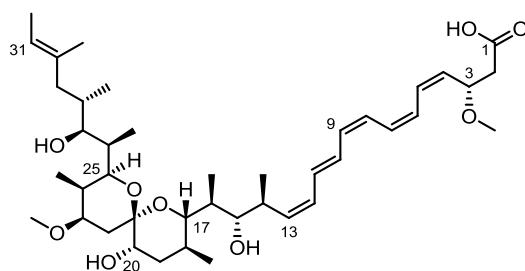
Hellgelbes Öl; 2.8 mg; $t_R = 15.5$ min (ESI-HRMS); $R_f = 0.12$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} = +3.0$ ($c = 0.5$, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.46), 332 (4.51), 317 (4.37), 304 nm (4.14); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) $\delta = 6.81$ (1H, m; H7), 6.77 (1H, m; H10), 6.63 (1H, m; H6), 6.59 (1H, m; H11), 6.20 (1H, m; H5), 6.16 (1H, m; H12), 6.13 (1H, m; H9), 6.08 (1H, m; H8), 5.64 (1H, t, $J = 10.6$ Hz; H13), 5.45 (1H, t, $J = 9.8$ Hz; H4), 5.15 (1H, t, $J = 7.1$ Hz; H31), 5.03 (1H, m; H3), 3.69 (1H, dd, $J = 10.1, 1.6$ Hz; H25), 3.66 (1H, m; H27), 3.63 (1H, m; H23), 3.60 (1H, dd, $J = 10.5, 0.8$ Hz; H17), 3.56 (1H, dd, $J = 9.8, 2.1$ Hz; H15), 3.39 (1H, t, $J = 2.7$ Hz; H20), 3.34 (3H, s; 23-OMe), 2.95 (1H, dqd, $J = 9.0, 6.9, 1.8$ Hz; H14), 2.68 (1H, d, $J = 12.8$ Hz; H_a29), 2.55 (1H, dd, $J = 15.1, 7.8$ Hz; H_a2), 2.42 (1H, dd, $J = 15.0, 5.3$ Hz; H_b2), 2.12 (1H, m; H24), 2.03 (3H, m; H_a22 ; H32), 1.92 (1H, m; H18), 1.83 (1H, dqd, $J = 9.9, 7.1, 1.1$ Hz; H26), 1.73 (2H, m; H_a19 ; H28), 1.67 (1H, m; H_b19), 1.59 (5H, m; H16; H_b29 ; 30-Me), 1.37 (1H, t, $J = 12.5$ Hz; H_b22), 1.12 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 14-Me), 0.96 (3H, t, $J = 7.5$ Hz; H33), 0.81 (3H, d, $J = 7.2$ Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, $J = 7.0$ Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 24-Me), 0.76 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 18-Me), 0.72 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) $\delta = 174.9$ (C; C1), 134.7 (CH; C13), 134.7 (C; C30), 134.0 (CH; C4), 132.0 (CH; C9), 131.4 (CH; C7), 131.3 (CH; C5), 130.9 (CH; C11), 130.6 (CH; C8), 130.2 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.6 (CH; C6), 129.6 (CH; C31), 99.6 (C; C21), 79.0 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.4 (CH; C27), 75.3 (CH; C17), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 65.8 (CH; C3), 55.6 (CH_3 ; 23-OMe), 46.2 (CH_2 ; C29), 43.7 (CH_2 ; C2), 40.2 (CH; C16), 38.0 (CH; C26), 37.5 (CH_2 ; C19), 36.3 (CH; C14), 35.4 (CH; C28), 34.1 (CH_2 ; C22), 33.1 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 22.3 (CH_2 ; C32), 19.7 (CH_3 ; 14-Me), 18.2 (CH_3 ; 18-Me), 16.1 (CH_3 ; 30-Me), 15.7 (CH_3 ; 28-Me), 14.9 (CH_3 ; C33), 9.6 (CH_3 ; 16-Me), 8.1 (CH_3 ; 26-Me), 4.3 (CH_3 ; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{NaO}_9$: 725.4599, gefunden 725.4590.

Spirangien J (S6)^[201]

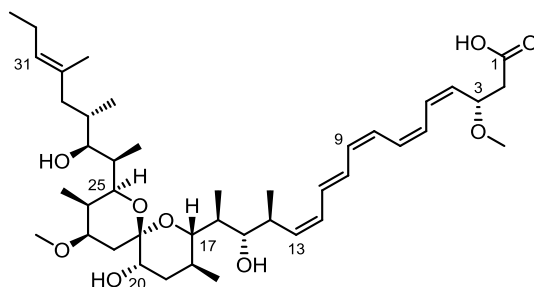
Hellgelbes Öl; 1.5 mg; t_R = 15.0 min (ESI-HRMS); R_f = 0.10 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ = +25.9 (c = 0.4, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 349 (4.31), 332 (4.31), 317 (4.18), 304 (3.97), 290 nm (3.75); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.57 (1H, dd, J = 14.6, 11.5 Hz; H11), 6.37 (1H, m; H9), 6.33 (1H, m; H5), 6.31 (1H, m; H7), 6.30 (1H, m; H10), 6.29 (1H, m; H8), 6.26 (1H, m; H6), 6.10 (1H, t, J = 11.2 Hz; H12), 5.76 (1H, dd, J = 14.9, 5.8 Hz; H4), 5.59 (1H, t, J = 10.6 Hz; H13), 5.22 (1H, q, J = 6.4 Hz; H31), 4.57 (1H, m, H3)^[202], 3.69 (1H, dd, J = 10.2, 1.7 Hz; H25), 3.65 (1H, m; H27), 3.64 (1H, m; H23), 3.59 (1H, dd, J = 10.4, 0.8 Hz; H17), 3.55 (1H, dd, J = 9.6, 2.1 Hz; H15), 3.39 (1H, t, J = 2.7 Hz; H20), 3.34 (3H, s; 23-OMe), 2.93 (1H, dqd, J = 9.0, 6.9, 1.8 Hz; H14), 2.67 (1H, d, J = 13.3 Hz; H_a29), 2.50 (1H, m; H_a2)^[202], 2.12 (1H, qdd, J = 6.5, 4.7, 1.5 Hz; H24), 2.03 (2H, dd, J = 13.0, 4.7 Hz; H_a22), 1.92 (1H, sptt, J = 6.0, 4.1 Hz; H18), 1.83 (1H, dqd, J = 9.9, 7.1, 1.1 Hz; H26), 1.73 (2H, m; H_a19; H28), 1.66 (1H, dt, J = 13.3, 3.6 Hz; H_b19), 1.59 (8H, m; H16; H_b29; H32; 30-Me), 1.37 (1H, t, J = 12.7 Hz; H_b22), 1.11 (3H, d, J = 7.0 Hz; 14-Me), 0.81 (3H, d, J = 7.0 Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, J = 7.0 Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, J = 6.8 Hz; 24-Me), 0.75 (3H, d, J = 6.6 Hz; 18-Me), 0.71 (3H, d, J = 6.7 Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ ^[201] (126 MHz, CD_3OD) δ = 136.1 (CH; C4), 136.1 (C; C30), 135.0 (CH; C9), 134.9 (CH; C8), 134.7 (CH; C7), 134.2 (CH; C10), 134.0 (CH; C13), 133.5 (CH; C6), 132.1 (CH; C5), 130.2 (CH; C12), 129.9 (CH; C11), 121.3 (CH; C31), 99.6 (C; C21), 79.0 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.3 (CH; C27), 75.3 (CH; C17), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 70.1 (CH; C3)^[198], 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.2 (CH₂; C29), 43.6 (CH₂; C2)^[198], 40.2 (CH; C16), 38.0 (CH; C26), 37.5 (CH₂; C19), 36.2 (CH; C14), 35.5 (CH; C28), 34.1 (CH₂; C22), 33.1 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 19.7 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.0 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C32), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.3 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{NaO}_9$: 711.4443, gefunden 711.4425.

Spirangien K (S7)^[201]

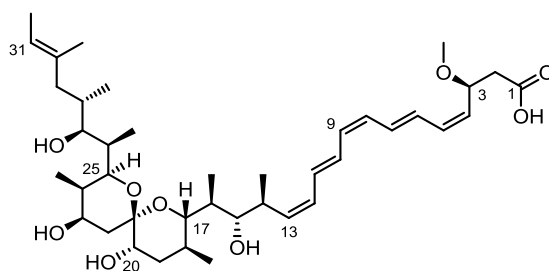
Hellgelbes Öl; 1.2 mg; t_R = 16.1 min (ESI-HRMS); R_f = 0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ = +23.0 (c = 0.1, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.34), 332 (4.34), 317 (4.13), 303 (3.81), 290 nm (3.50); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.58 (1H, dd, J = 14.4, 11.6 Hz; H11), 6.38 (1H, m; H9), 6.35 (1H, m; H5), 6.33 (1H, m; H7), 6.32 (1H, m; H8), 6.29 (1H, m; H10), 6.26 (1H, m; H6), 6.10 (1H, t, J = 11.2 Hz; H12), 5.60 (1H, m; H4), 5.57 (1H, m; H13), 5.22 (1H, m; H31), 4.10 (1H, q, J = 5.8 Hz; H3), 3.69 (1H, dd, J = 10.1, 1.7 Hz; H25), 3.65 (1H, m; H27), 3.63 (1H, m; H23), 3.59 (1H, dd, J = 10.5, 0.8 Hz; H17), 3.55 (1H, dd, J = 9.8, 2.3 Hz; H15), 3.38 (1H, t, J = 2.8 Hz; H20), 3.34 (3H, s; 23-OMe), 3.27 (3H, s; 3-OMe), 2.94 (1H, dqd, J = 10.3, 6.8, 2.8 Hz; H14), 2.67 (1H, d, J = 13.1 Hz; H_a29), 2.53 (1H, m; H_a2), 2.41 (1H, m; H_b2), 2.12 (1H, qdd, J = 6.5, 4.3, 1.8 Hz; H24), 2.03 (1H, dd, J = 12.9, 4.7 Hz; H_a22), 1.92 (1H, m; H18), 1.83 (1H, dqd, J = 9.9, 6.9, 0.8 Hz; H26), 1.74 (1H, m; H_a19), 1.71 (1H, m; H28), 1.66 (1H, dt, J = 13.3, 3.6 Hz; H_b19), 1.60 (8H, m; H16; H_b29; H32; 30-Me), 1.37 (1H, t, J = 12.5 Hz; H_b22), 1.11 (3H, d, J = 6.8 Hz; 14-Me), 0.81 (3H, d, J = 7.1 Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, J = 7.1 Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, J = 6.8 Hz; 24-Me), 0.75 (3H, d, J = 6.7 Hz; 18-Me), 0.71 (3H, d, J = 6.7 Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 136.1 (C; C30), 135.3 (CH; C9), 135.2 (CH; C7), 134.7 (CH; C10), 134.1 (CH; C4), 134.1 (CH; C5), 134.1 (CH; C8), 134.1 (CH; C13), 133.1 (CH; C6), 130.2 (CH; C12), 130.0 (CH; C11), 121.3 (CH; C31), 99.6 (C; C21), 80.6 (CH; C3)^[198], 79.0 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.3 (CH; C27), 75.3 (CH; C17), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 56.8 (CH₃; C41), 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.2 (CH₂; C29), 40.2 (CH; C16), 37.9 (CH; C26), 37.5 (CH₂; C19), 36.3 (CH; C14), 35.5 (CH; C28), 34.1 (CH₂; C22), 33.1 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 19.7 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.0 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C32), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.2 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{NaO}_9$: 725.4599, gefunden 725.4586.

Spirangien L (S8)

Hellgelbes Öl; 15.5 mg; $t_R = 15.7$ min (ESI-HRMS); $R_f = 0.48$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} = +8.0$ ($c = 1.0$, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 351 (4.41), 333 (4.44), 318 (4.36), 304 (4.18), 290 nm (3.98); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) $\delta = 6.64$ (1H, m; H6), 6.60 (1H, m; H11), 6.38 (1H, m; H7), 6.39 (1H, m; H9), 6.37 (1H, m; H8), 6.32 (1H, m; H10), 6.30 (1H, m; H5), 6.11 (1H, t, $J = 11.2$ Hz; H12), 5.61 (1H, t, $J = 10.6$ Hz; H13), 5.26 (1H, t, $J = 10.1$ Hz; H4), 5.21 (1H, m; H31), 4.61 (1H, td, $J = 8.6, 4.8$ Hz; H3), 3.69 (1H, dd, $J = 10.2, 1.7$ Hz; H25), 3.66 (1H, d, $J = 6.9$ Hz; H27), 3.64 (1H, m; H23), 3.59 (1H, d, $J = 10.4$ Hz; H17), 3.56 (1H, dd, $J = 9.8, 1.8$ Hz; H15), 3.38 (1H, m; H20), 3.34 (3H, m; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.94 (1H, m; H14), 2.66 (1H, d, $J = 12.8$ Hz; H_a29), 2.56 (1H, dd, $J = 15.1, 8.2$ Hz; H_a2), 2.40 (1H, m; H_b2), 2.11 (1H, m; H24), 2.02 (1H, m; H_a22), 1.94 (1H, m; H18), 1.83 (1H, m; H26), 1.74 (2H, m; H_a19 ; H28), 1.67 (1H, m; H_b19), 1.60 (8H, m; H16; H_b29 ; H32; 30-Me), 1.37 (1H, t, $J = 12.5$ Hz; H_b22), 1.11 (3H, d, $J = 6.9$ Hz; 14-Me), 0.81 (3H, d, $J = 7.2$ Hz; 26-Me), 0.79 (3H, d, $J = 7.0$ Hz; 16-Me), 0.77 (3H, d, $J = 6.9$ Hz; 24-Me), 0.75 (3H, d, $J = 6.6$ Hz; 18-Me), 0.71 (3H, d, $J = 6.6$ Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) $\delta = 174.5$ (C; C1), 137.1 (CH; C7), 136.1 (C; C30), 136.0 (CH; C9), 134.6 (CH; C10), 134.4 (CH; C13), 134.0 (CH; C5), 130.9 (CH; C4), 130.4 (CH; C11), 130.2 (CH; C12), 128.5 (CH; C6), 128.5 (CH; C8), 121.2 (CH; C31), 99.6 (C; C21), 78.9 (CH; C23), 76.7 (CH; C15), 76.3 (CH; C27), 75.3 (CH; C17), 74.9 (CH; C3), 72.6 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 56.7 (CH_3 ; 3-OMe), 55.6 (CH_3 ; 23-OMe), 46.1 (CH_2 ; C29), 42.0 (CH_2 ; C2), 40.2 (CH; C16), 37.9 (CH; C26), 37.5 (CH_2 ; C19), 36.3 (CH; C14), 35.5 (CH; C28), 34.1 (CH_2 ; C22), 33.1 (CH; C24), 25.8 (CH; C18), 19.7 (CH_3 ; 14-Me), 18.2 (CH_3 ; 18-Me), 16.0 (CH_3 ; 30-Me), 15.7 (CH_3 ; 28-Me), 13.7 (CH_3 ; C32), 9.6 (CH_3 ; 16-Me), 8.1 (CH_3 ; 26-Me), 4.2 (CH_3 ; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{NaO}_9$: 725.4599, gefunden 725.4583.

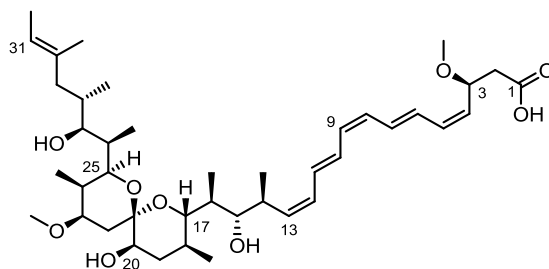
Spirangien M (S9)

Hellgelbes Öl; 1.9 mg; t_R = 16.3 min (ESI-HRMS); R_f = 0.47 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ = +22.0 (c = 0.1, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) 351 (3.92), 333 (3.94), 318 (3.82), 304 (3.60), 286 (3.46), 274 nm (3.43); $^1\text{H-NMR}$ (900 MHz, CD_3OD) δ = 6.67 (1H, m; H6), 6.60 (1H, dd, J = 14.1, 11.6 Hz; H11), 6.39 (1H, m; H9), 6.38 (1H, m; H7), 6.37 (1H, m; H8), 6.32 (1H, dd, J = 14.6, 10.6 Hz; H10), 6.28 (1H, t, J = 11.1 Hz; H5), 6.11 (1H, t, J = 11.1 Hz; H12), 5.61 (1H, t, J = 10.6 Hz; H13), 5.27 (1H, t, J = 10.1 Hz; H4), 5.15 (1H, t, J = 6.5 Hz; H31), 4.62 (1H, m; H3), 3.69 (1H, m; H25), 3.65 (1H, m; H27), 3.64 (1H, m; H23), 3.60 (1H, d, J = 10.6 Hz; H17), 3.56 (1H, d, J = 11.1 Hz; H15), 3.39 (2H, m; H20), 3.34 (3H, br. s; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.94 (1H, m; H14), 2.68 (1H, d, J = 12.1 Hz; H_a29), 2.54 (1H, br. s.; H_a2), 2.40 (1H, br. s.; H_b2), 2.12 (1H, m; H24), 2.05 (1H, m; H_a22), 2.02 (1H, m; H32), 1.93 (1H, m; H18), 1.83 (1H, m; H26), 1.76 (1H, d, J = 2.5 Hz; H_a19), 1.73 (1H, m; H28), 1.67 (1H, d, J = 10.1 Hz; H_b19), 1.60 (8H, m; H16; H_b29; 30-Me), 1.37 (1H, m; H_b22), 1.11 (3H, d, J = 7.1 Hz; 14-Me), 0.96 (3H, t, J = 7.3 Hz; H33), 0.81 (3H, d, J = 7.1 Hz; 26-Me), 0.80 (3H, d, J = 7.1 Hz; 16-Me), 0.78 (3H, d, J = 6.5 Hz; 24-Me), 0.76 (3H, d, J = 6.5 Hz; 18-Me), 0.72 (3H, d, J = 6.5 Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 174.4 (C; C1)^[203], 136.7 (CH; C7), 135.7 (CH; C9), 134.7 (CH; C10), 134.7 (C; C30), 134.3 (CH; C13), 134.2 (CH; C8), 133.7 (CH; C5), 130.9 (CH; C4), 130.3 (CH; C11), 130.2 (CH; C12), 129.6 (CH; C31), 128.9 (CH; C6), 99.6 (C; C21), 79.0 (C; C23), 76.7 (CH; C15), 76.4 (CH; C27), 75.3 (CH; C3), 75.3 (CH; C17), 72.6 (C; C25), 71.2 (CH; C20), 56.6 (CH₃; 3-OMe), 55.6 (CH₃; 23-OMe), 46.2 (CH₂; C29), 42.1 (CH₂; C2)^[198], 40.2 (CH; C16), 38.0 (C; C26), 37.5 (CH₂; C19), 36.3 (CH; C14), 35.4 (CH; C28), 34.1 (CH₂; C22), 33.1 (C; C24), 25.8 (CH; C18), 22.3 (CH₂; C32), 19.8 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.1 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 14.9 (CH₃; C33), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.1 (CH₃; 26-Me), 4.3 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{O}_9$: 717.4936, gefunden 717.4956.

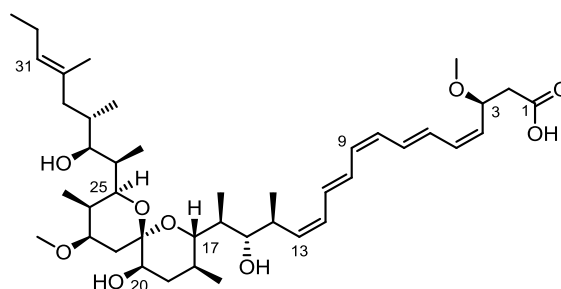
Spirangien N (S10)^[201]

Hellgelbes Öl; 2.2 mg; t_R = 14.9 min (ESI-HRMS); R_f = 0.19 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} = -1.7$ ($c = 0.3$, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.30), 332 (4.36), 317 (4.20), 304 (3.93), 290 nm (3.65); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.85 (1H, dd, $J = 14.4, 11.4$ Hz; H7), 6.79 (1H, dd, $J = 14.5, 11.3$ Hz; H10), 6.67 (1H, dd, $J = 13.6, 11.8$ Hz; H6), 6.60 (1H, dd, $J = 14.3, 11.5$ Hz; H11), 6.36 (1H, t, $J = 11.2$ Hz; H5), 6.18 (1H, m; H12), 6.14 (1H, m; H9), 6.11 (1H, m; H8), 5.64 (1H, t, $J = 10.6$ Hz; H13), 5.30 (1H, t, $J = 10.0$ Hz; H4), 5.22 (1H, q, $J = 6.4$ Hz; H31), 4.62 (1H, m; H3), 4.06 (1H, dt, $J = 12.0, 4.7$ Hz; H23), 3.71 (1H, dd, $J = 10.1, 1.7$ Hz; H25), 3.65 (1H, d, $J = 9.5$ Hz; H27), 3.59 (1H, dd, $J = 10.3, 0.6$ Hz; H17), 3.55 (1H, dd, $J = 9.8, 2.0$ Hz; H15), 3.39 (1H, t, $J = 2.8$ Hz; H20), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.94 (1H, dqd, $J = 10.3, 6.8, 2.8$ Hz; H14), 2.67 (1H, m; H_a29), 2.58 (1H, br. s.; H_a2), 2.40 (1H, d, $J = 9.8$ Hz; H_b2), 1.96 (1H, dd, $J = 12.9, 4.7$ Hz; H_a22), 1.91 (2H, m; H18; H24), 1.81 (1H, m; H26), 1.75 (1H, m; H_a19), 1.72 (1H, m; H28), 1.67 (1H, m; H_b19), 1.60 (8H, m; H16; H_b29; H32; 30-Me), 1.42 (1H, t, $J = 12.6$ Hz; H_b22), 1.11 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 14-Me), 0.82 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 24-Me), 0.80 (3H, m; 26-Me), 0.78 (3H, m; 16-Me), 0.75 (3H, d, $J = 6.5$ Hz; 18-Me), 0.71 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 136.1 (C; C30), 134.7 (CH; C13), 133.9 (CH; C5), 132.3 (CH; C4), 132.0 (CH; C9), 131.7 (CH; C7), 131.0 (CH; C11), 130.5 (CH; C8), 130.2 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.4 (CH; C6), 121.2 (CH; C31), 99.6 (C; C21), 76.7 (CH; C15), 76.3 (CH; C27), 75.2 (CH; C17), 72.8 (CH; C25), 71.2 (CH; C20), 69.4 (CH; C23), 56.7 (CH₃; 3-OMe), 46.2 (CH₂; C29), 40.3 (CH; C16), 37.9 (CH; C26), 37.6 (CH₂; C19), 37.0 (CH; C24), 36.2 (CH; C14), 36.2 (CH₂; C22), 35.5 (CH; C28), 25.8 (CH; C18), 19.9 (CH₃; 14-Me), 18.2 (CH₃; 18-Me), 16.0 (CH₃; 30-Me), 15.7 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C32), 9.6 (CH₃; 16-Me), 8.0 (CH₃; 26-Me), 4.2 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{O}_9$: 689.4623, gefunden 689.4623.

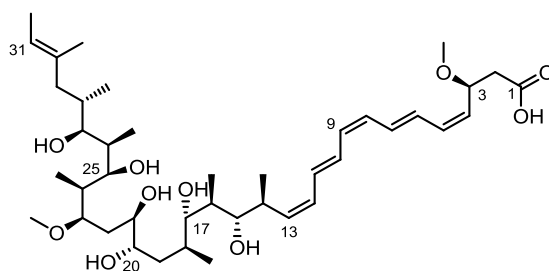
Spirangien O (S11)



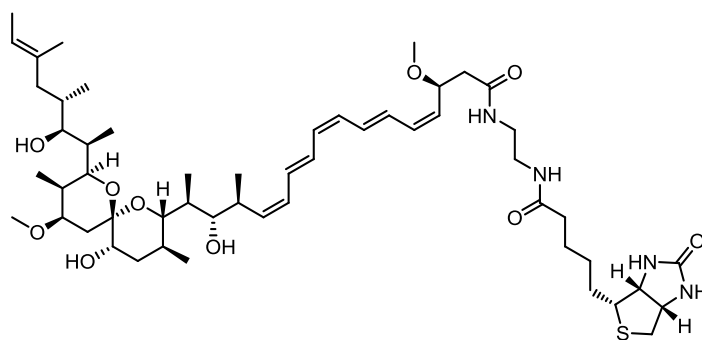
Hellgelbes Öl; 10.9 mg; $t_R = 14.2$ min (ESI-HRMS); $R_f = 0.21$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} = +6.6$ ($c = 0.5$, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.50), 332 (4.55), 317 (4.39), 304 nm (4.12); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) $\delta = 6.84$ (1H, dd, $J = 14.6, 11.0$ Hz; H7), 6.78 (1H, dd, $J = 14.4, 11.0$ Hz; H10), 6.68 (1H, dd, $J = 14.4, 11.6$ Hz; H6), 6.60 (1H, dd, $J = 14.5, 11.5$ Hz; H11), 6.35 (1H, t, $J = 11.3$ Hz; H5), 6.19 (1H, t, $J = 11.1$ Hz; H12), 6.14 (1H, m; H9), 6.10 (1H, m; H8), 5.57 (1H, t, $J = 10.5$ Hz; H13), 5.30 (1H, t, $J = 10.1$ Hz; H4), 5.20 (1H, q, $J = 6.5$ Hz; H31), 4.63 (1H, td, $J = 8.4, 5.5$ Hz; H3), 3.82 (1H, dd, $J = 10.3, 1.8$ Hz; H25), 3.73 (1H, dt, $J = 12.0, 4.7$ Hz; H23), 3.66 (1H, dd, $J = 9.6, 1.6$ Hz; H17), 3.58 (1H, dd, $J = 9.8, 1.6$ Hz; H27), 3.49 (1H, dd, $J = 7.7, 3.8$ Hz; H15), 3.43 (1H, dd, $J = 11.0, 1.5$ Hz; H20), 3.34 (3H, s; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.95 (1H, dqd, $J = 10.3, 6.9, 3.8$ Hz; H14), 2.66 (1H, d, $J = 12.7$ Hz; H_a29), 2.54 (1H, m; H_a2), 2.37 (1H, dd, $J = 15.0, 4.8$ Hz; H_b2), 2.15 (1H, qdd, $J = 6.9, 4.7, 1.8$ Hz; H24), 1.88 (1H, m; H_a19), 1.86 (1H, m; H26), 1.79 (2H, m; H18; H_a22), 1.73 (1H, m; H16), 1.69 (1H, m; H28), 1.58 (8H, m; H_b22 ; H_b29 ; H32; 30-Me), 1.37 (1H, ddd, $J = 14.0, 9.2, 1.5$ Hz; H_b19), 1.07 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 14-Me), 0.85 (3H, m; 16-Me), 0.84 (3H, m; 18-Me), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 26-Me), 0.78 (3H, d, $J = 6.8$ Hz; 24-Me), 0.69 (3H, d, $J = 6.7$ Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) $\delta = 174.7$ (C; C1)^[203], 136.2 (C; C30), 135.8 (CH; C13), 133.6 (CH; C5), 132.1 (CH; C9), 131.7 (CH; C4), 131.7 (CH; C7), 131.0 (CH; C11), 130.6 (CH; C8), 130.3 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.6 (CH; C6), 121.2 (CH; C31), 99.8 (C; C21), 78.9 (CH; C23), 78.6 (CH; C15), 76.6 (CH; C20), 76.5 (CH; C17), 75.7 (CH; C3), 75.2 (CH; C27), 72.9 (CH; C25), 56.7 (CH₃; 3-OMe), 55.7 (CH₃; 23-OMe), 46.1 (CH₂; C29), 42.9 (CH₂; C2)^[198], 39.1 (CH; C16), 37.2 (CH; C26), 36.8 (CH; C14), 35.7 (CH₂; C19), 35.5 (CH; C28), 34.7 (CH; C18), 33.2 (CH; C24), 31.2 (CH₂; C22), 19.4 (CH₃; 14-Me), 16.8 (CH₃; 18-Me), 15.8 (CH₃; 30-Me), 15.4 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C32), 9.9 (CH₃; 16-Me), 8.0 (CH₃; 26-Me), 4.3 (CH₃; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{O}_9$: 703.4780, gefunden 703.4787.

Spirangien P (S12)^[201]

Hellgelbes Öl; 2.2 mg; t_R = 14.8 min (ESI-HRMS); R_f = 0.29 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ = +15.7 (c = 0.7, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.61), 332 (4.65), 317 (4.50), 304 (4.23), 290 nm (3.95); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.84 (1H, dd, J = 14.5, 10.8 Hz; H7), 6.78 (1H, dd, J = 14.5, 11.1 Hz; H10), 6.67 (1H, t, J = 14.0 Hz; H6), 6.60 (1H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz; H11), 6.35 (2H, t, J = 11.2 Hz; H5), 6.19 (1H, t, J = 11.1 Hz; H12), 6.14 (1H, m; H9), 6.10 (1H, m; H8), 5.57 (1H, t, J = 10.4 Hz; H13), 5.30 (1H, t, J = 9.8 Hz; H4), 5.14 (1H, t, J = 7.2 Hz; H31), 4.63 (1H, m; H3), 3.82 (1H, dd, J = 10.3, 1.8 Hz; H25), 3.73 (1H, m; H23), 3.66 (1H, dd, J = 9.6, 1.6 Hz; H17), 3.58 (1H, dd, J = 9.8, 1.6 Hz; H27), 3.49 (1H, dd, J = 7.7, 3.8 Hz; H15), 3.44 (1H, dd, J = 10.9, 1.6 Hz; H20), 3.34 (3H, m; 23-OMe), 3.26 (4H, s; 3-OMe), 2.95 (1H, dqd, J = 10.4, 6.7, 4.0 Hz; H14), 2.67 (1H, m; H_a 29), 2.56 (1H, m; H_a 2), 2.39 (1H, m; H_b 2), 2.15 (1H, m; H24), 2.03 (2H, m; H32), 1.89 (1H, m; H_a 19), 1.86 (1H, m; H25), 1.79 (2H, m; H18; H_a 22), 1.73 (1H, m; H16), 1.68 (1H, m; H28), 1.59 (4H, m; H_b 22; 30-Me), 1.56 (1H, m; H_b 29), 1.38 (1H, m; H_b 19), 1.07 (3H, d, J = 6.8 Hz; 14-Me), 0.95 (3H, m; H33), 0.85 (3H, m; 16-Me), 0.83 (3H, m; 18-Me), 0.79 (3H, m; 26-Me), 0.78 (3H, m; 24-Me), 0.70 (3H, d, J = 6.7 Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 136.0 (CH; C13), 134.7 (C; C30), 133.9 (CH; C5), 132.2 (CH; C9), 131.9 (CH; C7), 131.8 (CH; C4), 131.1 (CH; C11), 130.5 (CH; C8), 130.3 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.6 (CH; C31), 129.4 (CH; C6), 99.8 (C; C21), 79.0 (CH; C23), 78.7 (CH; C15), 76.6 (CH; C20), 76.5 (CH; C17), 75.3 (CH; C27), 75.2 (CH; C3), 73.0 (CH; C25), 56.7 (CH_3 ; 3-OMe), 55.7 (CH_3 ; 23-OMe), 46.1 (CH_2 ; C29), 39.1 (CH; C16), 37.2 (CH; C26), 36.8 (CH; C14), 35.8 (CH_2 ; C19), 35.4 (CH; C28), 34.7 (CH; C18), 33.3 (CH; C24), 31.3 (CH_2 ; C22), 22.3 (CH_2 ; C32), 19.4 (CH_3 ; 14-Me), 16.8 (CH_3 ; 18-Me), 16.0 (CH_3 ; 30-Me), 15.3 (CH_3 ; 28-Me), 15.0 (CH_3 ; C33), 9.9 (CH_3 ; 16-Me), 8.0 (CH_3 ; 26-Me), 4.3 (CH_3 ; 24-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{NaO}_9$: 739.4756, gefunden 739.4737.

Spirangien Q (13)^[201]

Hellgelbes Öl; 2.6 mg; t_R = 14.0 min (ESI-HRMS); R_f = 0.30 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ = +9.6 (c = 0.5, Methanol); UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 350 (4.66), 332 (4.71), 317 (4.55), 304 nm (4.28); $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CD_3OD) δ = 6.85 (1H, dd, J = 14.4, 11.2 Hz; H7), 6.78 (1H, dd, J = 14.5, 11.1 Hz; H10), 6.68 (1H, dd, J = 14.0, 11.6 Hz; H6), 6.60 (1H, dd, J = 14.2, 11.6 Hz; H11), 6.35 (1H, t, J = 11.2 Hz; H5), 6.19 (1H, t, J = 11.2 Hz; H12), 6.15 (1H, t, J = 10.8 Hz; H9), 6.10 (1H, t, J = 10.8 Hz; H8), 5.57 (1H, t, J = 10.5 Hz; H13), 5.30 (1H, t, J = 10.1 Hz; H4), 5.22 (1H, m; H31), 4.63 (1H, m; H3), 3.72 (1H, m; H21), 3.68 (2H, m; H17; H25), 3.61 (1H, dd, J = 9.5, 1.5 Hz; H27), 3.57 (1H, ddd, J = 9.4, 5.3, 2.4 Hz; H23), 3.47 (1H, dd, J = 7.7, 3.8 Hz; H15), 3.43 (3H, s; 23-OMe), 3.26 (3H, s; 3-OMe), 2.94 (1H, dqd, J = 10.2, 6.8, 3.7 Hz; H14), 2.61 (1H, d, J = 13.1 Hz; H_a29), 2.54 (1H, m; H_a2), 2.37 (1H, m; H_b2), 1.94 (1H, m; H24), 1.83 (1H, td, J = 7.1, 1.7 Hz; H26), 1.80 (1H, m; H_a19), 1.71 (1H, m; H28), 1.69 (1H, m; H16), 1.57 (10H, m; H18; H_a20; H_a22; H_b29; H32; 30-Me), 1.48 (1H, m; H_b22), 1.37 (1H, m; H_b20), 1.34 (1H, m; H_b19), 1.07 (3H, d, J = 6.8 Hz; 14-Me), 0.92 (3H, d, J = 6.8 Hz; 24-Me), 0.86 (3H, d, J = 6.8 Hz; 26-Me), 0.82 (3H, d, J = 6.8 Hz; 16-Me), 0.79 (3H, d, J = 6.8 Hz; 18-Me), 0.72 (3H, d, J = 6.8 Hz; 28-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, CD_3OD) δ = 136.1 (C; C30), 135.7 (CH; C13), 133.7 (CH; C5), 132.1 (CH; C9), 131.7 (CH; C4), 131.7 (CH; C7), 131.0 (CH; C11), 130.6 (CH; C8), 130.3 (CH; C12), 129.7 (CH; C10), 129.6 (CH; C6), 121.3 (CH; C31), 81.9 (CH; C23), 78.5 (CH; C15), 76.5 (CH; C27), 75.8 (CH; C17), 75.4 (CH; C25), 74.8 (CH; C3)^[198], 69.7 (CH; C21), 58.6 (CH₃; 23-OMe), 56.7 (CH₃; 3-OMe), 45.5 (CH₂; C29), 40.3 (CH₂; C22), 39.0 (CH; C16), 39.0 (CH; C24), 37.7 (CH; C26), 37.4 (CH; C18), 36.7 (CH₂; C14), 36.7 (CH₂; C20), 35.7 (CH; C28), 30.5 (CH₂; C19), 19.4 (CH₃; 14-Me), 16.0 (CH₃; 18-Me), 15.8 (CH₃; 30-Me), 15.5 (CH₃; 28-Me), 13.7 (CH₃; C32), 10.1 (CH₃; 26-Me), 10.1 (CH₃; 24-Me), 9.7 (CH₃; 16-Me) ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{NaO}_9$: 729.4912, gefunden 729.4895.

Darstellung biotinyliertes Spirangien A^[204]

6.6 mg (9.4 μmol) Spirangien A wurden in einem dunklen Reaktionsgefäß in 50 μL DMF gelöst und unter Rühren 2 μL (14 μmol) Triethylamin zugetropft. 5.3 mg (14 μmol) HBTU in 50 μL DMF sowie 4.0 mg (10 μmol) *N*-Biotinyl-ethylendiamin-trifluoracetat in 30 μL DMF wurden zu der Reaktionsmischung gegeben. Die Lösung wurde unter DC-Kontrolle für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mit Hilfe einer Pipettensäule säulenchromatographisch aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:1, dann $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1, dann $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:9). Biotinyliertes Spirangien A konnte in 45% Ausbeute (4.1 mg, 4.2 μmol).

Hellgelbes Öl; R_f = 0.20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:1); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ = 6.85 (1H, dd, J = 14.6, 11.0 Hz), 6.79 (1H, dd, J = 14.7, 11.1 Hz), 6.66 (1H, m), 6.60 (1H, m), 6.36 (1H, t, J = 11.2 Hz), 6.18 (1H, m), 6.16 (1H, m), 6.12 (1H, m), 5.65 (1H, t, J = 10.8 Hz), 5.29 (1H, t, J = 10.0 Hz), 5.22 (1H, q, J = 6.1 Hz), 4.61 (1H, td, J = 8.2, 5.3 Hz), 4.49 (1H, ddd, J = 7.9, 5.0, 0.8 Hz), 4.30 (1H, dd, J = 7.9, 4.4 Hz), 3.69 (1H, dd, J = 10.1, 1.6 Hz), 3.64 (2H, m), 3.59 (1H, d, J = 10.4 Hz), 3.56 (1H, m), 3.38 (1H, m), 3.34 (3H, m), 3.27 (4H, m), 3.26 (3H, m), 3.21 (1H, m), 2.96 (1H, m), 2.92 (1H, dd, J = 12.7, 5.0 Hz), 2.70 (1H, d, J = 12.7 Hz), 2.66 (1H, m), 2.48 (1H, dd, J = 14.0, 8.1 Hz), 2.30 (1H, dd, J = 14.0, 5.3 Hz), 2.20 (2H, td, J = 7.4, 2.2 Hz), 2.12 (1H, m), 2.03 (1H, dd, J = 13.0, 4.8 Hz), 1.92 (1H, m), 1.83 (1H, dd, J = 9.2, 7.2 Hz), 1.74 (1H, m), 1.66 (3H, m), 1.60 (9H, m), 1.44 (2H, m), 1.37 (1H, t, J = 12.5 Hz), 1.12 (3H, d, J = 6.9 Hz), 0.82 (3H, m), 0.79 (3H, m), 0.77 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.75 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.71 (3H, d, J = 6.6 Hz) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ ^[198,203] δ = 176.0, 172.8, 165.7, 135.6, 134.5, 133.7, 132.1, 131.8, 131.3, 130.7, 130.0, 129.8, 129.4, 128.9, 120.9, 99.1, 78.6, 76.4, 76.0, 75.0, 74.9, 72.3, 70.8, 63.2, 61.5, 56.9, 56.4, 55.2, 46.0, 43.5, 40.9, 40.0, 37.6, 37.2, 36.6, 36.0, 35.3, 33.9, 32.8, 29.4, 26.9, 26.7, 25.5, 19.5, 18.0, 15.7, 15.5, 13.4, 9.4, 7.8, 4.0 ppm; ESI-HRMS: berechnet für $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_4\text{NaO}_9\text{S}$: 993.6326, gefunden 993.6325.

7 Literaturverzeichnis

- [1] H. Reichenbach, G. Höfle, *Myxobacteria as Producers of Secondary Metabolites*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1999**.
- [2] a) J. Davies, *ASM News* **1999**, 65, 304–310; b) J. Houbroken, J. C. Frisvad, R. A. Samson, *IMA fungus* **2011**, 2, 87–95.
- [3] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311–335.
- [4] D. Klayman, *Science* **1985**, 228, 1049–1055.
- [5] H. A. Gallis, R. H. Drew, W. W. Pickard, *Clin. Infect. Dis.* **1990**, 12, 308–329.
- [6] M. V. Blagosklonny, Z. N. Demidenko, M. Giovino, C. Szynal, E. Donskoy, R. A. Herrmann, J. J. Barry, A. M. Whalen, *Cell Cycle* **2014**, 5, 1574–1579.
- [7] M. Z. Abdin, M. Israr, R. U. Rehman, S. K. Jain, *Planta Med.* **2003**, 69, 289–299.
- [8] M. Z. Abdin, M. Israr, R. U. Rehman, S. K. Jain, *Planta Med.* **2003**, 69, 289–299.
- [9] C. J. Paddon, J. D. Keasling, *Nature Rev. Microbiol.* **2014**, 12, 355–367.
- [10] a) M. Oura, T. H. Sternberg, E. T. Wright, *Antibiot. Annu.* **1955**, 3, 566–573; b) E. T. Stiller, J. Vandeputte, J. L. Wachtel, *Antibiot. Annu.* **1955**, 3, 587–591; c) W. P. Jambor, B. A. Steinberg, L. O. Suydam, *Antibiot. Annu.* **1955**, 3, 574–578.
- [11] B. Dupont, *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49 Suppl 1, 31–36.
- [12] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2327.
- [13] S. Bentebibel, E. Moyano, J. Palazón, R. M. Cusidó, M. Bonfill, R. Eibl, M. T. Piñol, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 89, 647–655.
- [14] C. Walsh, *Antibiotics. Actions, origins, resistance*, ASM Press, Washington, D.C., **2003**.
- [15] a) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5072–5129; b) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5194–5254.
- [16] *Drug Discovery and Development. Understanding the R & D Process*, **2007**, Pharmaceutical Research and Manufactures of America, Washington, DC, USA.
- [17] K. H. Bleicher, H.-J. Böhm, K. Müller, A. I. Alanine, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 369–378.
- [18] G. R. Lenz, H. M. Nash, S. Jindal, *Drug Discov. Today* **2000**, 5, 145–156.
- [19] S. W. Drew, A. L. Demain, *Ann. Rev. Microbiol.* **1977**, 31, 343–356.

- [20] R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis, *Biochem. Mol. Biol. Plants* **2000**, 24, 1250–1319.
- [21] R. N. Bennett, R. M. Wallsgrove, *New Phytol.* **1994**, 127, 617–633.
- [22] K. J. Weissman, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 1276–1295.
- [23] J. Berdy, *Proceedings of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes* **1995**, 13–34.
- [24] W. Fenical, P. R. Jensen in *Marine Biotechnology. Volume 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (Hrsg.: D. H. Attaway, O. R. Zaborsky), Springer US, **1993**.
- [25] W. R. Strohl, *Drugs Pharm. Sci.* **1997**, 82, 1–47.
- [26] C. T. Walsh, *Science* **2004**, 303, 1805–1810.
- [27] M.-A. Jacques, C. E. Morris, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1995**, 18, 1–14.
- [28] S. S. Hirano, C. D. Upper, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 624–653.
- [29] S. E. Lindow, J. H. J. Leveau, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 238–243.
- [30] H. Kunoh in *Microbial ecology of the phylloplane* (Hrsg.: J. P. Blakeman), Academic Press, London, New York, **1981**.
- [31] B. Brunel, C. Perissol, M. Fernandez, J. M. Boeufgras, J. Le Petit, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1994**, 14, 331–342.
- [32] K. Clay, *New Phytol.* **1994**, 126, 223–231.
- [33] K. B. Johnson, V. O. Stockwell, *Annu. Rev. Phytopathol.* **1998**, 36, 227–248.
- [34] M. C. M. Perombelon in *Microbial ecology of the phylloplane* (Hrsg.: J. P. Blakeman), Academic Press, London, New York, **1981**.
- [35] K. D. Stromberg, L. L. Kinkel, K. J. Leonard, *Biol. Control* **2000**, 17, 61–72.
- [36] A. M. Abou-Zeid, A. D. Altalh, R. E. A. El-Fattah, *Mycopat.* **2009**, 7, 11–20.
- [37] a) G. Berg, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 84, 11–18; b) E. Montesinos, A. Bonaterra, E. Badosa, J. Francés, J. Alemany, I. Llorente, C. Moragrega, *Int. Microbiol.* **2002**, 5, 169–175; c) C. H. Wu, S. M. Bernard, G. L. Andersen, W. Chen, *Microb. Biotechnol.* **2009**, 2, 428–440.
- [38] J. A. Jehle, A. Herz, B. Keller, R. G. Kleespies, E. Koch, A. Larem, A. Schmitt, D. Stephan, *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* **2014**, 173.
- [39] C. H. Wu, S. M. Bernard, G. L. Andersen, W. Chen, *Microb. Biotechnol.* **2009**, 2, 428–440.
- [40] a) E. Montesinos, A. Bonaterra, E. Badosa, J. Francés, J. Alemany, I. Llorente, Moragrega C., *Int. Microbiol.* **2002**, 5, 169–175; b) B. J. J. Lugtenberg, T. F. C.

- Chin-A-Woeng, G. V. Bloemberg, *Ant. van Leeuw.* **2002**, *81*, 373–383; c) G. Berg, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 11–18.
- [41] N. Kucheryava, M. Fiss, G. Auling, R. M. Kroppenstedt, *System. Appl. Microbiol.* **1999**, *22*, 472–478.
- [42] M. Fiss, N. Kucheryava, J. Schönherr, A. Kollar, G. Arnold, G. Auling, Z. *Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **2000**, *107*, 1–11.
- [43] M. Fiss, O. Barckhausen, Y. Gherbawy, A. Kollar, M. Hamamoto, G. Auling, Z. *Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **2003**, *110*, 513–523.
- [44] R. A. Slepecky, H. E. Hemphill in *The Prokaryotes, Second edition. A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification, Application* (Eds.) (Hrsg.: Below A., H. G. Trüper, Dworkin M., W. Harder, K. Schleifer), Springer, **1992**.
- [45] W. D. Rosenfeld, C. E. Zobell, *J. Bacteriol.* **1947**, *54*, 393–398.
- [46] P. Wipf, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115–2134.
- [47] E. Montesinos, *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *270*, 1–11.
- [48] A. Rüegger, M. Kuhn, H. Lichti, H.-R. Loosli, R. Huguenin, C. Quiquerez, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075–1092.
- [49] M. Dreyfuss, E. Härrli, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache, H. Tscherter, *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1976**, *3*, 125–133.
- [50] H. Svarstad, H. C. Bugge, S. S. Dhillion, *Biodivers. Conserv.* **2000**, *9*, 1521–1541.
- [51] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler, H. Stähelin, *Agents Actions* **1976**, *6*, 468–475.
- [52] B. A. Johnson, H. Anker, F. L. Meleney, *Science* **1945**, *102*, 376–377.
- [53] a) N.-H. Tan, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 840–895; b) N. Fusetani, S. Matsunaga, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1793–1806; c) R. E. Moore, *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *16*, 134–143.
- [54] M. S. Donia, B. Wang, D. C. Dunbar, P. V. Desai, A. Patny, M. Avery, M. T. Hamann, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 941–945.
- [55] A. Rudi, M. Akin, E. M. Gaydou, Y. Kashman, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13203–13210.
- [56] H. Sone, H. Kigoshi, K. Yamada, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8149–8154.
- [57] R. G. Linington, J. González, L.-D. Ureña, L. I. Romero, E. Ortega-Barría, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 397–401.
- [58] K. Fujii, K. Sivonen, T. Kashiwagi, K. Hirayama, K.-I. Harada, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5777–5782.

- [59] A. Wélé, C. Mayer, D. Quentin, Y. Zhang, A. Blond, B. Bodo, *Tetrahedron* **2009**, 65, 275–281.
- [60] M. B. de Abreu, F. D. Piaz, A. Temraz, A. Bader, N. de Tommasi, A. Braca, *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1336–1342.
- [61] P.-W. Hsieh, F.-R. Chang, C.-C. Wu, K.-Y. Wu, C.-M. Li, S.-L. Chen, Y.-C. Wu, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1522–1527.
- [62] L. Ding, S. Qin, F. Li, X. Chi, H. Laatsch, *Curr. Microbiol.* **2008**, 56, 229–235.
- [63] J. L. Johnson, W. G. Jackson, T. E. Eble, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2947–2948.
- [64] S. Elkahoui, H. Abdel rahim, O. Tabbene, M. Shaaban, F. Limam, H. Laatsch, *Nat. Prod. Res.* **2013**, 27, 108–116.
- [65] G. S. Jayatilake, M. P. Thornton, A. C. Leonard, J. E. Grimwade, B. J. Baker, *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 293–296.
- [66] B. Liebermann, W. Ihn, E. Baumann, D. Tresselt, *Phytochemistry* **1988**, 27, 357–359.
- [67] L. Du, X. Yang, T. Zhu, F. Wang, X. Xiao, H. Park, Q. Gu, *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, 57, 873–876.
- [68] N. A. J. C. Furtado, M. T. Pupo, I. Carvalho, V. L. Campo, M. C. T. Duarte, J. K. Bastos, *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 1448–1453.
- [69] P. de Carvalho, M., W.-R. Abraham, *CMC* **2012**, 19, 3564–3577.
- [70] V. A. Basiuk, T. Y. Gromovoy, A. A. Chuiko, V. A. Soloshonok, V. P. Kukhar, *Synthesis* **1992**, 449–451.
- [71] S. D. Bull, S. G. Davies, R. M. Parkin, F. Sánchez-Sancho, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 2313–2320.
- [72] F. Fdhila, V. Vázquez, J. L. Sánchez, R. Riguera, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1299–1301.
- [73] H.-G. Byun, H. Zhang, M. Mochizuki, K. Adachi, Y. Shizuri, W.-J. Lee, S.-K. Kim, *J. Antibiot.* **2003**, 56, 102–106.
- [74] A. C. Stierle, J. H. Cardellina, G. A. Strobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, 8008–8011.
- [75] G. Degrassi, C. Aguilar, M. Bosco, S. Zahariev, S. Pongor, V. Venturi, *Curr. Microbiol.* **2002**, 45, 250–254.
- [76] K. Strom, J. Sjogren, A. Broberg, J. Schnurer, *Appl. Environ. Microb.* **2002**, 68, 4322–4327.

- [77] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
- [78] S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Drug Disc.* **2009**, *12*, 220–230.
- [79] S. C. Wenzel, R. Müller, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 567–574.
- [80] R. O. Garcia, D. Krug, R. Müller in *Methods in Enzymology*, Vol. 458 (Hrsg.: D. A. Hopwood), Academic Press, **2009**.
- [81] a) H. Reichenbach, K. Gerth, H. Irschik, B. Kunze, G. Höfle, *Trends Biotechnol.* **1988**, *6*, 115–121; b) H. Reichenbach, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2001**, *27*, 149–156.
- [82] a) K. Ravensschlag, K. Sahm, J. Pernthaler, R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3982–3989; b) H. Reichenbach, *Environ. Microbiol.* **1999**, *1*, 15–21.
- [83] L. J. Shimkets, M. Dworkin, H. Reichenbach in *The Prokaryotes* (Hrsg.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt), Springer New York, New York, NY, **2006**.
- [84] H. B. Kaplan, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 572–577.
- [85] M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Hrsg.) *The Prokaryotes*, Springer New York, New York, NY, **2006**.
- [86] a) H. Chen, I. M. Keseler, L. J. Shimkets, *J. Bacteriol.* **1999**, *172*, 4206–4213; b) B. Neumann, A. Pospiech, H. U. Schairer, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 6307–6310; c) S. Pradella, A. Hans, C. Spröer, H. Reichenbach, K. Gerth, S. Beyer, *Arch. Microbiol.* **2002**, *178*, 484–492.
- [87] a) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416; b) R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [88] A. Conlin, M. Fornier, C. Hudis, S. Kar, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 953–954.
- [89] H. B. Bode, R. Müller in *Myxobacteria: multicellularity and differentiation*. (Hrsg.: D. Whitworth), ASM Press, Chicago, **2007**.
- [90] R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, *1994*, 759–773.
- [91] H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 7–13.
- [92] a) D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4898–4901; b) D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4985–4988; c) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, G.

- Höfle, *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 1997, 1725–1732; d) D. Whitworth (Hrsg.) *Myxobacteria: multicellularity and differentiation.*, ASM Press, Chicago, **2007**.
- [93] K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 560–563.
- [94] I. H. Hardt, H. Steinmetz, K. Gerth, F. Sasse, H. Reichenbach, G. Höfle, *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 847–856.
- [95] J. Niggemann, N. Bedorf, U. Flörke, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, 5013–5018.
- [96] a) C. Gregg, C. Gunawan, A. W. Y. Ng, S. Wimala, S. Wickremasinghe, M. A. Rizzacasa, *Org. Lett.* **2013**, 15, 516–519; b) C. Gregg, M. V. Perkins, *Tetrahedron* **2013**, 69, 387–394; c) A. Guérinot, G. Lepesqueux, S. Sablé, S. Reymond, J. Cossy, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 5151–5163; d) M. Lorenz, M. Kalesse, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2905–2907; e) M. Lorenz, M. Kalesse, *Org. Lett.* **2008**, 10, 4371–4374.
- [97] I. Paterson, A. D. Findlay, E. A. Anderson, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6819–6822.
- [98] I. Paterson, A. D. Findlay, C. Noti, *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 594–611.
- [99] M. R. Reboll, B. Ritter, F. Sasse, J. Niggemann, R. Frank, M. Nourbakhsh, *ChemBioChem* **2012**, 13, 409–415.
- [100] B. Frank, J. Knauber, H. Steinmetz, M. Scharfe, H. Blöcker, S. Beyer, R. Müller, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 221–233.
- [101] a) J.-W. Ahn, *B. Korean Chem. Soc.* **2009**, 30, 742–744; b) J.-W. Ahn, *B. Korean Chem. Soc.* **2009**, 30, 1218–1220; c) J. H. Kwak, J.-W. Ahn, *Arch. Pharm. Res.* **2009**, 32, 841–844.
- [102] G. Bifulco, P. Dambruoso, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3744–3779.
- [103] N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 866–876.
- [104] a) Y. Kobayashi, J. Lee, K. Tezuka, Y. Kishi, *Org. Lett.* **1999**, 1, 2177–2180; b) J. Lee, Y. Kobayashi, K. Tezuka, Y. Kishi, *Org. Lett.* **1999**, 1, 2181–2184; c) T. R. Hoye, J. C. Suhadolnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4402–4403.
- [105] W. Koźmiński, D. Nanz, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 294–299.
- [106] D. Menche, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 905–918.
- [107] J. Hassfeld, C. Farès, H. Steinmetz, T. Carlomagno, D. Menche, *Org. Lett.* **2006**, 8, 4751–4754.
- [108] W. H. Gerwick, B. S. Moore, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 85–98.

- [109] a) K. T. Johansen, S. G. Wubshet, N. T. Nyberg, J. W. Jaroszewski, *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 2454–2461; b) S. G. Wubshet, K. T. Johansen, N. T. Nyberg, J. W. Jaroszewski, *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 876–882; c) M. Månsson, R. K. Phipps, L. Gram, M. H. G. Munro, T. O. Larsen, K. F. Nielsen, *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 1126–1132.
- [110] a) Z. E. Perlman, *Science* **2004**, 306, 1194–1198; b) W. R. Wong, A. G. Oliver, R. G. Linington, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1483–1495.
- [111] H. Laatsch (Hrsg.) *Antibase, A Data Base for Rapid Dereplication and Structure Determination of Microbial Natural Products*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2013**.
- [112] Department of Chemistry, University of Canterbury, *MarinLit*, **2013**, zu finden unter <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>.
- [113] *Dictionary of Natural Products*, Chapman & Hall Chemical Database, **2013**.
- [114] K. F. Nielsen, J. Smedsgaard, *J. Chromatogr.* **2003**, 1002, 111–136.
- [115] T. El-Elmat, M. Figueroa, B. M. Ehrmann, N. B. Cech, C. J. Pearce, N. H. Oberlies, *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1709–1716.
- [116] D. Krug, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 768–783.
- [117] J. Y. Yang, L. M. Sanchez, C. M. Rath, X. Liu, P. D. Boudreau, N. Bruns, E. Glukhov, A. Wodtke, R. de Felicio, A. Fenner et al., *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1686–1699.
- [118] W.-T. Liu, A. Lamsa, W. R. Wong, P. D. Boudreau, R. Kersten, Y. Peng, W. J. Moree, B. M. Duggan, B. S. Moore, W. H. Gerwick et al., *J. Antibiot.* **2014**, 67, 99–104.
- [119] D. D. Nguyen, C.-H. Wu, W. J. Moree, A. Lamsa, M. H. Medema, X. Zhao, R. G. Gavilan, M. Aparicio, L. Atencio, C. Jackson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2013**, 110, E2611-E2620.
- [120] P. Cuatrecasas, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1972**, 69, 1277–1281.
- [121] a) B. Wang, R. Malik, E. A. Nigg, R. Körner, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9526–9533; b) D. L. Swaney, C. D. Wenger, J. J. Coon, *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 1323–1329.
- [122] S. Ziegler, V. Pries, C. Hedberg, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 2744–2792.
- [123] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 14694–14699.

- [124] C. Stadler, M. Skogs, H. Brismar, M. Uhlén, E. Lundberg, *Clinical Proteomics (3rd EuPA Meeting)* **2010**, 73, 1067–1078.
- [125] zu finden unter <http://www.leinco.com/immunohistochemistry>.
- [126] J. L. Vanneste, J. Yu, S. V. Beer, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 2785–2796.
- [127] W. Piepersberg, A. Zeek in *Handbuch der Biotechnologie* (Hrsg.: U. Faust, P. Praeve, W. Sittig, D. A. Sukatsch), Oldenbourg Industrieverlag, **1994**.
- [128] Y. C. Park, S. P. Gunasekera, J. V. Lopez, P. J. McCarthy, A. E. Wright, *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 580–584.
- [129] A. Wélé, Y. Zhang, C. Caux, J.-P. Brouard, J.-L. Pousset, B. Bodo, *C. R. Chimie* **2004**, 7, 981–988.
- [130] M. Wilson, H. A. S. Epton, D. C. Sigeo, *Phytopathology* **1992**, 82, 914–918.
- [131] S. Nishanth Kumar, C. Mohandas, J. V. Siji, K. N. Rajasekharan, B. Nambisan, *J. Appl. Microbiol.* **2012**, 113, 914–924.
- [132] Y.-M. Ying, W.-G. Shan, W.-H. Liu, Z.-J. Zhan, *Chem. Nat. Compd.* **2013**, 49, 184–186.
- [133] S. Cheenpracha, R. P. Borris, T. T. Tran, J. M. Jee, H. F. Seow, H.-Y. Cheah, C. C. Ho, L. C. Chang, *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 223–229.
- [134] S. Nishanth Kumar, V. S. Nath, R. Pratap Chandran, B. Nambisan, *World J. Microb. Biot.* **2014**, 30, 439–449.
- [135] F. J. Schmitz, D. J. Vanderah, K. H. Hollenbeak, C. E. L. Enwall, Y. Gopichand, P. K. SenGupta, M. B. Hossain, D. Van der Helm, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3941–3945.
- [136] S. Nishanth Kumar, B. Nambisan, A. Sundaresan, C. Mohandas, R. J. Anto, *Ann. Microbiol.* **2014**, 64, 209–218.
- [137] R. S. Wodzinski, J.-P. Paulin, *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, 76, 603–607.
- [138] M. Ginz, U. Engelhardt, *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 213, 8–11.
- [139] S. Gruenewald, H. D. Mootz, P. Stehmeier, T. Stachelhaus, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 3282–3291.
- [140] S. Sioud, I. Karray-Rebai, H. Aouissaoui, B. Aigle, S. Bejar, L. Mellouli, *J. Biomed. Biotechnol.* **2007**, 2007.
- [141] K. Ienaga, K. Nakamura, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1285–1286.
- [142] a) W. Pickenhagen, P. Dietrich, *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 1078–1086; b) M. Ginz, U. H. Engelhardt, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3528–3532; c) M. Gautschi, J. P. Schmid, T. L. Peppard, T. P. Ryan, R. M. Tuorto, X. Yang, *J. Agric. Food Chem.*

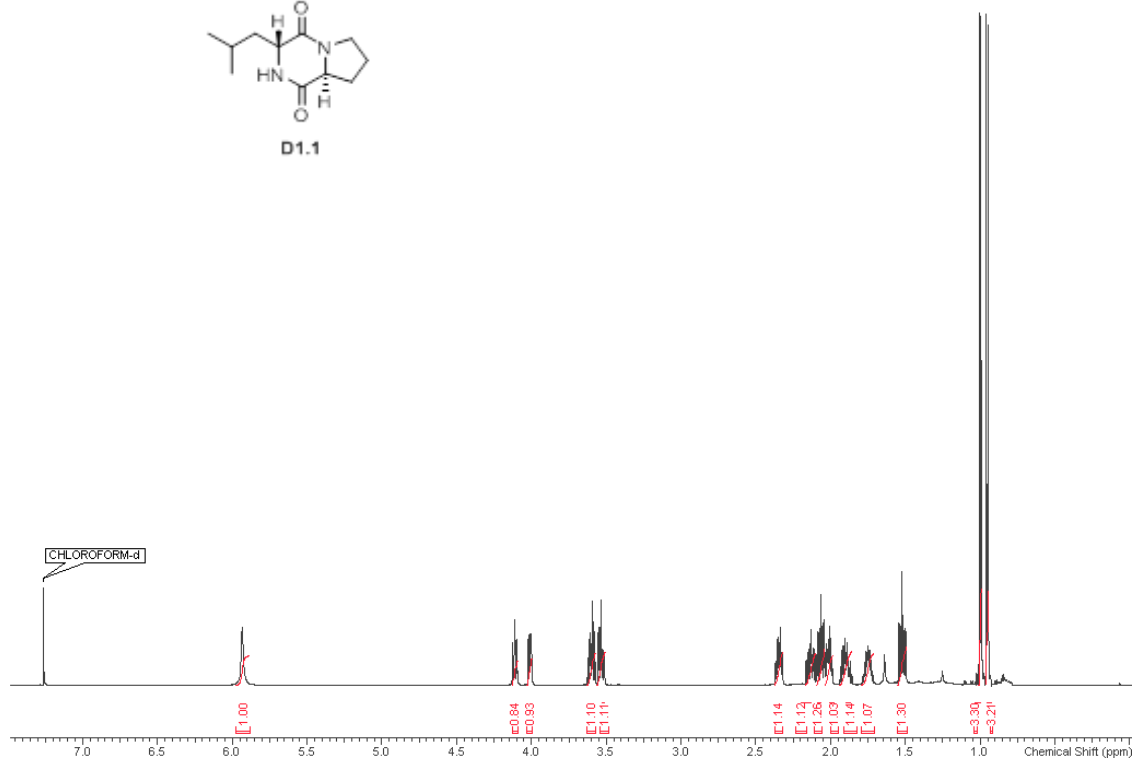
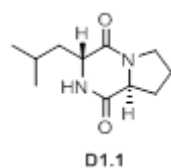
- 1997**, *45*, 3183–3189; d) M. Z. Chen, M. L. Dewis, K. Kraut, D. Merritt, L. Reiber, L. Trinnaman, N. C. Da Costa, *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C100–C105.
- [143] J. Niggemann, P. Bozko, N. Bruns, A. Wodtke, M. T. Gieseler, K. Thomas, C. Jahns, M. Nimtz, I. Reupke, T. Brüser et al., *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1021–1029.
- [144] Persönliche Mitteilung von Jutta Niggemann.
- [145] R. Bhushan, H. Brückner, *Amino Acids* **2004**, *27*, 231–247.
- [146] C. Jahns, *Totalsynthese von Pellasoren A und Baceridin und Studien zur Totalsynthese der Aetheramide A und B*, **2012**, Dissertation.
- [147] M. Rechsteiner, C. P. Hill, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 27–33.
- [148] C. Wójcik, G. N. DeMartino, *Int. J. Biochem. Cell B.* **2003**, *35*, 579–589.
- [149] M. Boccadoro, G. Morgan, J. Cavenagh, *Cancer Cell Int.* **2005**, *5*, 18.
- [150] J. Nam, D. Shin, Y. Rew, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8747–8755.
- [151] X. Fang, J. Nam, D. Shin, Y. Rew, D. L. Boger, S. Walker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6189–6191.
- [152] Y. Z. Frohwein, Z. Dafni, M. Friedman, R. I. Mateles, *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 679–680.
- [153] V. M. Dembitsky, I. Shkrob, O. Lev, *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1359–1366.
- [154] B. Yang, J. Hu, H. Lei, X.-Q. Chen, X.-F. Zhou, Y.-H. Liu, *Chem. Nat. Compd.* **2012**, *48*, 350–351.
- [155] M. Takai, S. Miyamoto, Y. Hattori, S. Tamura, *Agr. Biol. Chem.* **1963**, *27*, 876–877.
- [156] O. Guzmán-López, Á. Trigos, F. J. Fernández, M. Jesús Yañez-Morales, G. Saucedo-Castañeda, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 1473–1477.
- [157] W. A. Ayer, L. M. Browne, M.-C. Feng, H. Orszanska, H. Saeedi-Ghomi, *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 904–909.
- [158] F. Ehrlich, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 883–889.
- [159] R. W. Jackson, *J. Biol. Chem.* **1930**, *88*, 659–662.
- [160] B. K. Chowdhury, D. P. Chakraborty, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 481–483.
- [161] M. Shin, T. Shinguu, K. Sano, C. Umezawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1792–1795.
- [162] E. A. Schneider, R. A. Gibson, F. Wightman, *J. Exp. Bot.* **1972**, *23*, 152–170.
- [163] E. Nakajima, H. Nakano, K. Yamada, H. Shigemori, K. Hasegawa, *Phytochemistry* **2002**, *61*, 863–865.

- [164] a) G. Wang, S. Dai, M. Chen, H. Wu, L. Xie, X. Luo, X. Li, *Chem. Nat. Compd.* **2010**, *46*, 583–585; b) X. Lu, Y. Shen, Y. Zhu, Q. Xu, X. Liu, K. Ni, X. Cao, W. Zhang, B. Jiao, *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45*, 290–292; c) K. Yonezawa, K. Yamada, I. Kouno, *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 106–108.
- [165] a) C. Jahns, T. Hoffmann, S. Müller, K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Reichenbach, M. Kalesse, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5239–5243; b) M. Bock, K. Buntin, R. Müller, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2308–2311; c) D. Menche, F. Arikan, O. Perlova, N. Horstmann, W. Ahlbrecht, S. C. Wenzel, R. Jansen, H. Irschik, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14234–14243.
- [166] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79.
- [167] P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657.
- [168] A. Kitsche, M. Kalesse, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 851–861.
- [169] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [170] Das Isolierungspaper beschreibt einen etwas anderen Wert von 0.7 ng mL⁻¹.
- [171] Bettina Frank, *Polyketidbiosynthese in Myxobakterien*, **2007**, Dissertation.
- [172] B. Frank, J. Knauber, H. Steinmetz, M. Scharfe, H. Blöcker, S. Beyer, R. Müller, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 221–233.
- [173] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- [174] H. Ikeda, S. Omura, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2591–2610.
- [175] P. Sun, Q. Zhao, F. Yu, H. Zhang, Z. Wu, Y. Wang, Y. Wang, Q. Zhang, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1540–1548.
- [176] A. R. Gallimore, C. B. W. Stark, A. Bhatt, B. M. Harvey, Y. Demydchuk, V. Bolanos-Garcia, D. J. Fowler, J. Staunton, P. F. Leadlay, J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 453–460.
- [177] zu finden unter <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11205D>.
- [178] J. Ellis, *Nature* **1987**, *328*, 378–379.
- [179] M. Johnson, M. Sharma, B. R. Henderson, *Cell. Signal.* **2009**, *21*, 1471–1478.
- [180] Q. Göthel, M. Köck, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 613–621.
- [181] J. Garcia, S. Barluenga, K. Gorska, F. Sasse, N. Winssinger, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 672–680.
- [182] zu finden unter http://www.nature.com/nmeth/journal/v6/n9/fig_tab/nmeth.f.265_F1.html.

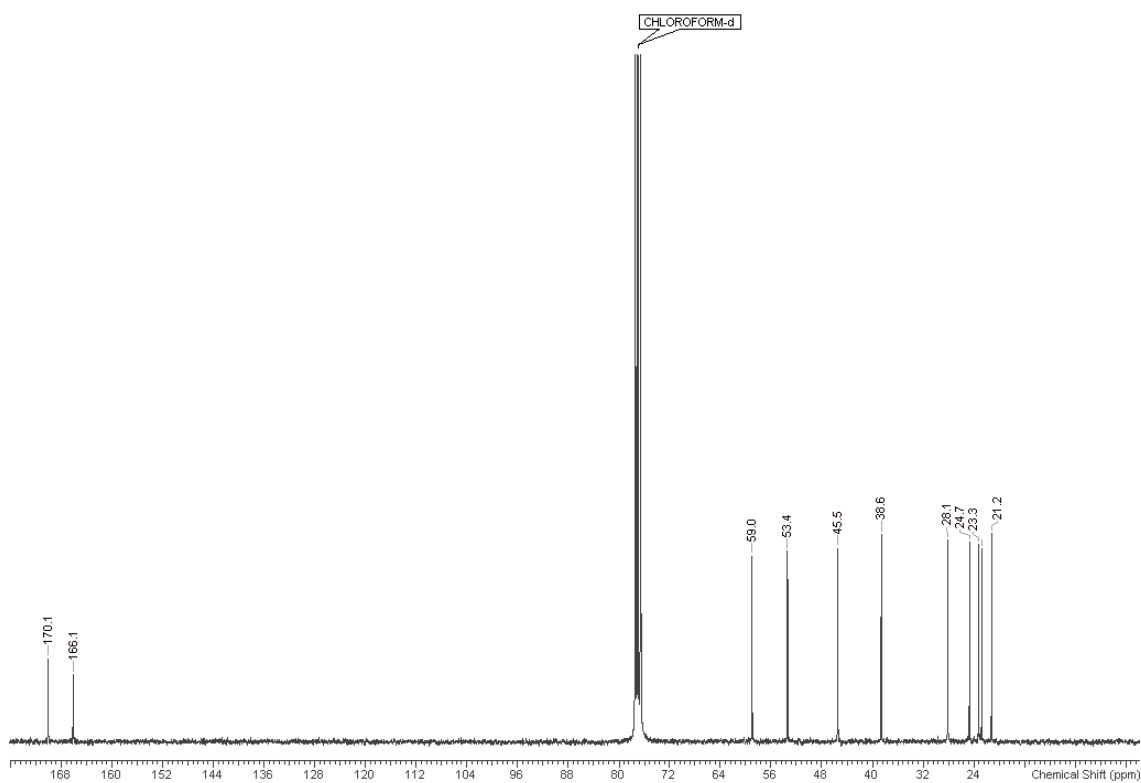
- [183] H. Köster, D. P. Little, P. Luan, R. Muller, S. M. Siddiqi, S. Marappan, P. Yip, *Assay Drug Dev. Techn.* **2007**, *5*, 381–390.
- [184] S.-E. Ong, M. Schenone, A. A. Margolin, X. Li, K. Do, M. K. Doud, D. R. Mani, L. Kuai, X. Wang, J. L. Wood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **2009**, *106*, 4617–4622.
- [185] a) S.-E. Ong, M. Mann, *Nat. protoc.* **2006**, *1*, 2650–2660; b) U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem Biol.* **2009**, *5*, 616–624.
- [186] J. Watrous, P. Roach, T. Alexandrov, B. S. Heath, J. Y. Yang, R. D. Kersten, M. van der Voort, K. Pogliano, H. Gross, J. M. Raaijmakers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E1743.
- [187] a) zu finden unter <http://apps.cytoscape.org/apps/fm3>; b) M. E. Smoot, K. Ono, J. Ruscheinski, P.-L. Wang, T. Ideker, *Bioinformatics* **2011**, *27*, 431–432.
- [188] D. D. Nguyen, C.-H. Wu, W. J. Moree, A. Lamsa, M. H. Medema, X. Zhao, R. G. Gavilan, M. Aparicio, L. Atencio, C. Jackson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, E2611.
- [189] R. Y. Stanier, G. C. Bazine, *Ann. Rev. Microbiol.* **1977**, *31*, 225–274.
- [190] J. Orjala, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 427–430.
- [191] a) G. J. Hooper, J. Orjala, R. C. Schatzman, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 529–533; b) E. J. Kim, J. H. Lee, H. Choi, A. R. Pereira, Y. H. Ban, Y. J. Yoo, E. Kim, J. W. Park, D. H. Sherman, W. H. Gerwick et al., *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5824–5827.
- [192] K. L. McPhail, J. Correa, R. G. Linington, J. Gonzalez, E. Ortega-Barría, T. L. Capson, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 984–988.
- [193] L. M. Sanchez, D. Lopez, B. A. Vesely, G. Della Togna, W. H. Gerwick, D. E. Kyle, R. G. Linington, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4187–4197.
- [194] W. H. Gerwick, P. J. Proteau, D. G. Nagle, E. Hamel, A. Blokhin, D. L. Slate, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1243–1245.
- [195] B. Márquez, P. Verdier-Pinard, E. Hamel, W. H. Gerwick, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2387–2389.
- [196] ProteoWizard Software Foundation, **2013**.
- [197] A. M. Frank, M. M. Savitski, M. L. Nielsen, R. A. Zubarev, P. A. Pevzner, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 114–123.
- [198] Über ^1H , ^{13}C -HSQC-Korrelationen bestimmt.
- [199] Die quartären Kohlenstoffatome wurden nicht bestimmt.
- [200] C. L. Allen, C. Burel, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2724–2726.

- [201] C-1 konnte nicht bestimmt werden. Die Verschiebung sollte bei etwa 174.7 ppm liegen.
- [202] Über ^1H , ^1H -COSY-Korrelationen bestimmt.
- [203] Über ^1H , ^{13}C -HMBC-Korrelationen bestimmt.
- [204] G. Pototschnig, C. M. de Csáky, J. R. Montenegro Burke, G. Schitter, A. E. Stütz, C. A. Tarling, S. G. Withers, T. M. Wrodnigg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4077–4079.

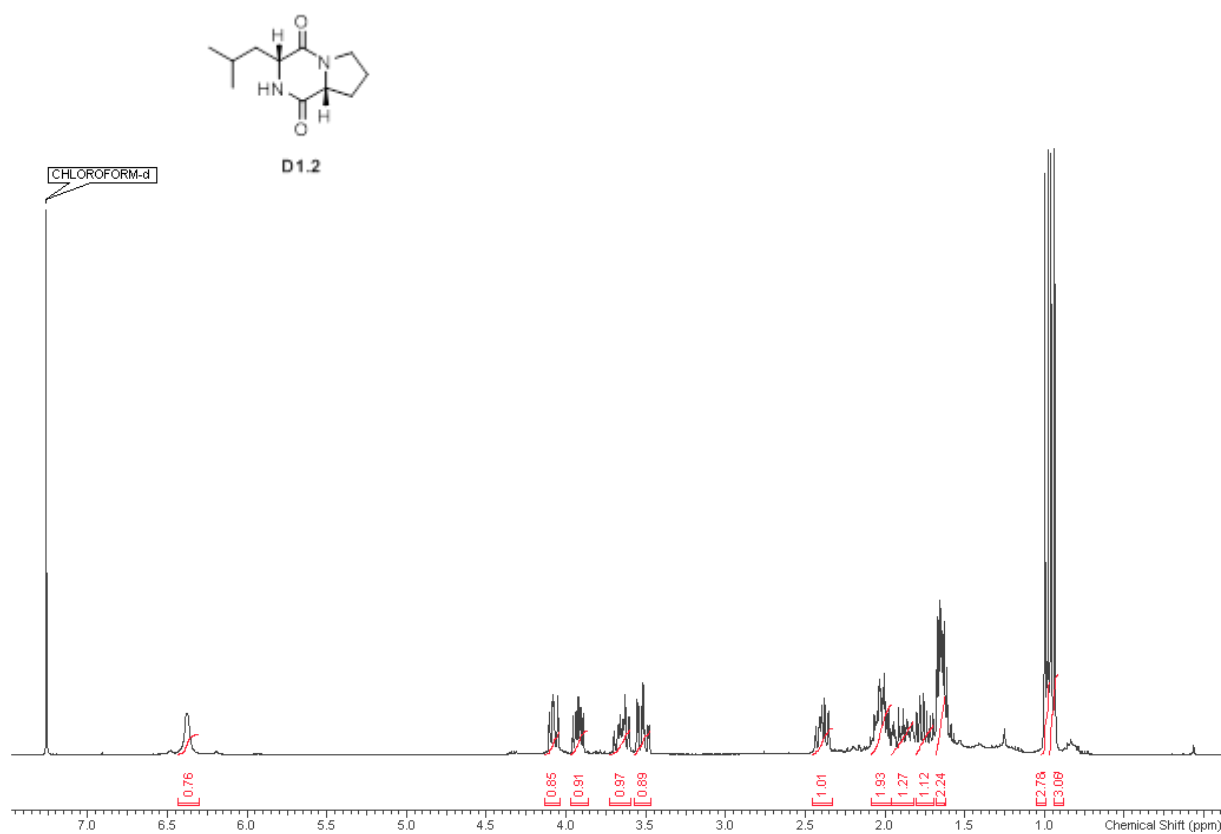
8 Anhang



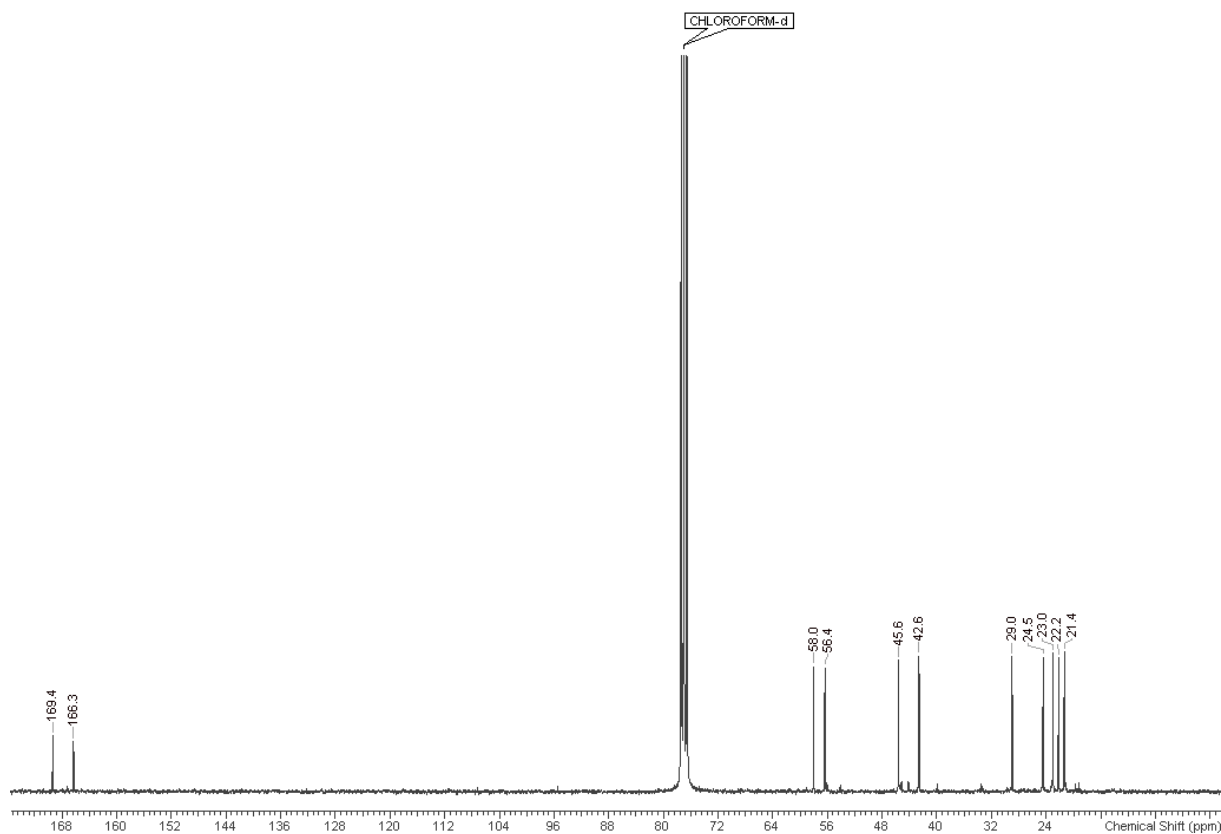
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-D-Leu) **D1.1** (600 MHz, CDCl₃).



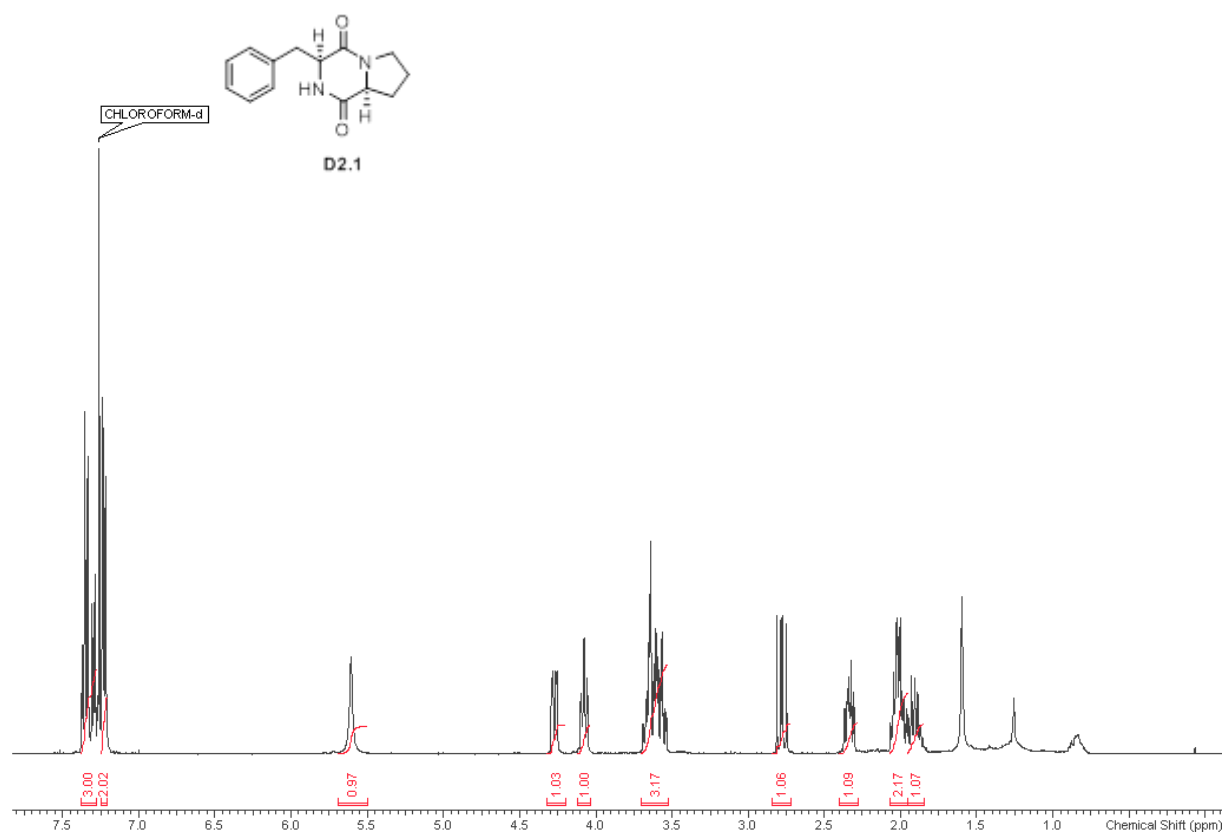
¹³C-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-D-Leu) **D1.1** (75 MHz, CDCl₃).



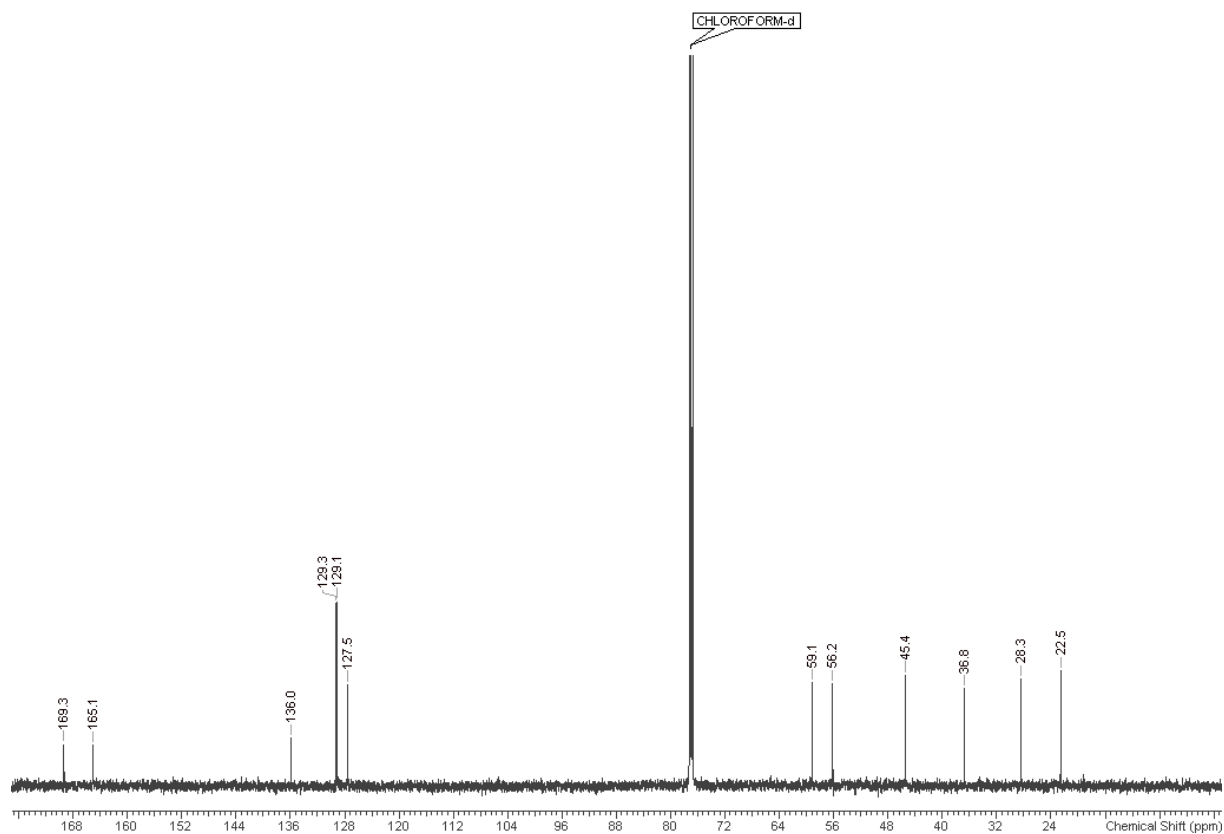
^1H -NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-D-Leu) **D1.2** (300 MHz, CDCl_3).



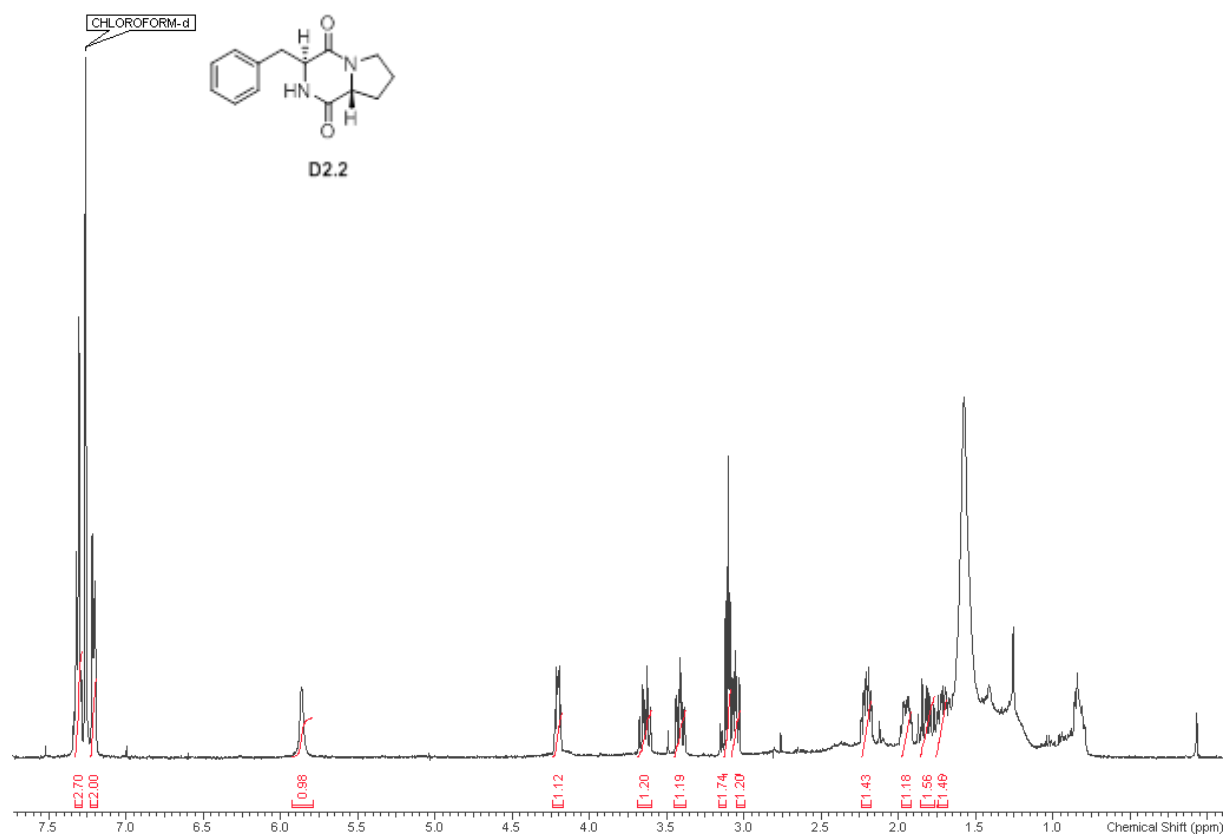
^{13}C -NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-D-Leu) **D1.2** (75 MHz, CDCl_3).



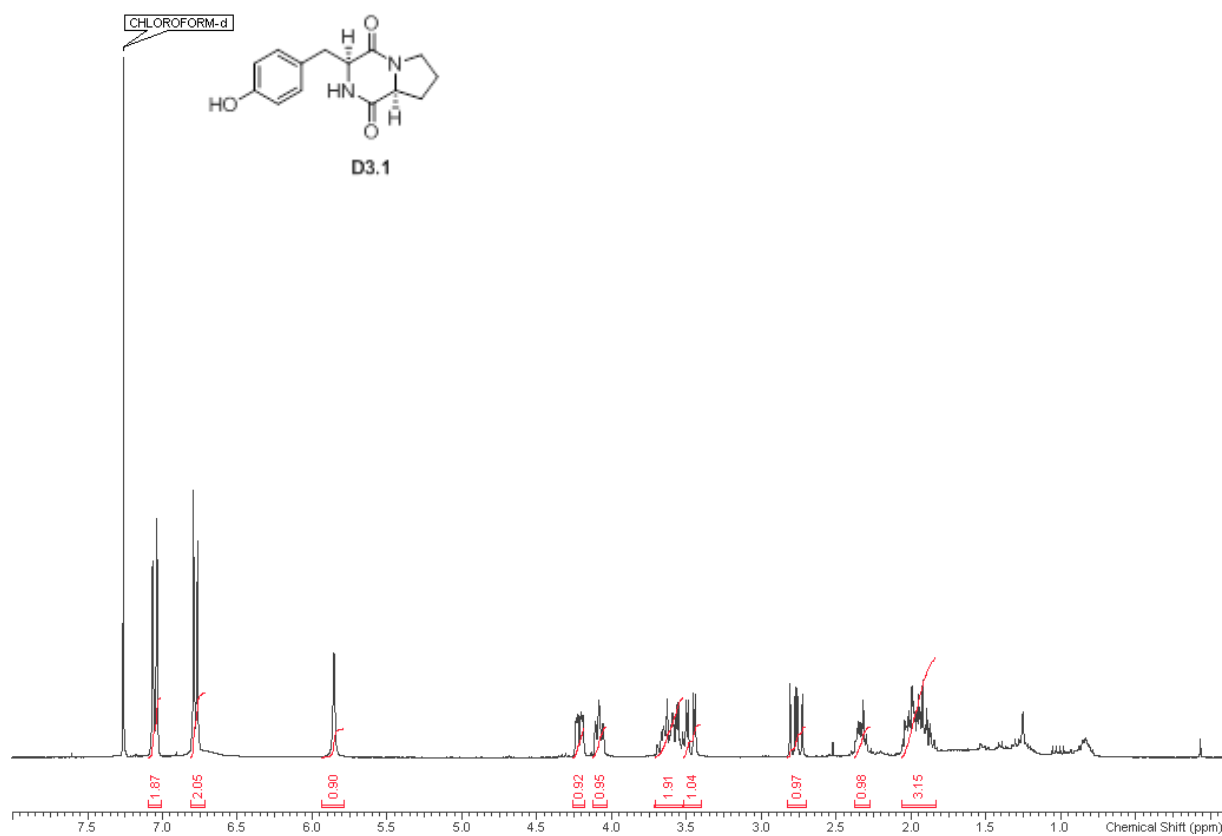
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-L-Phe) **D2.1** (400 MHz, CDCl₃).



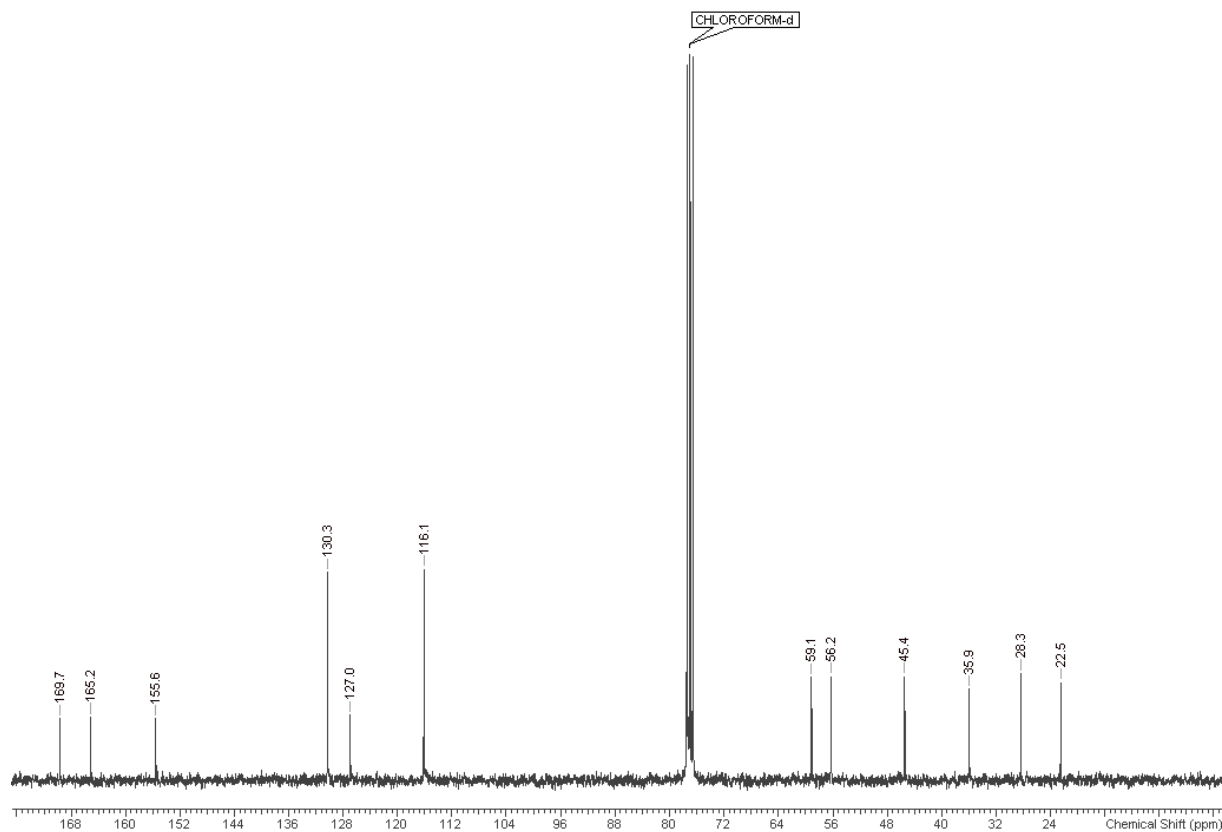
¹³C-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-L-Phe) **D2.1** (75 MHz, CDCl₃).



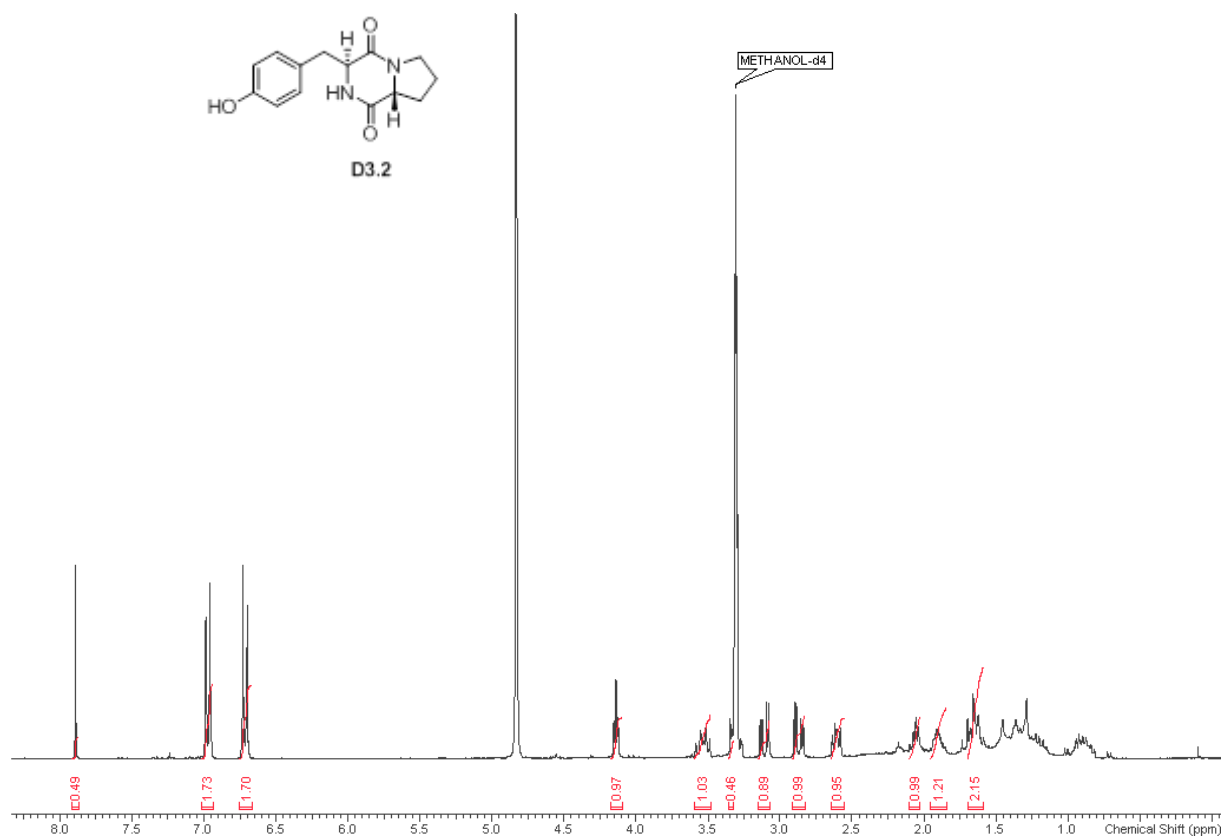
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-L-Phe) **D2.2** (400 MHz, CDCl₃).



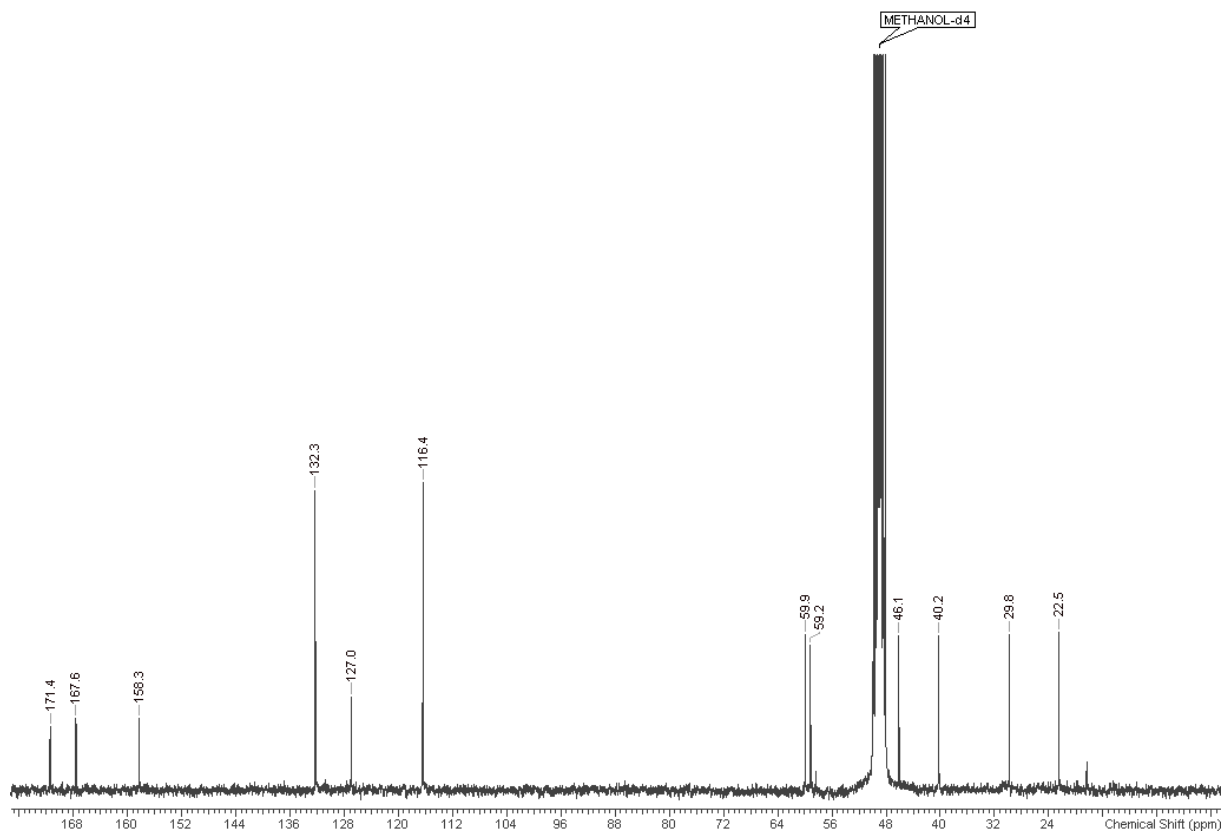
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-L-Tyr) **D3.1** (300 MHz, CDCl₃).



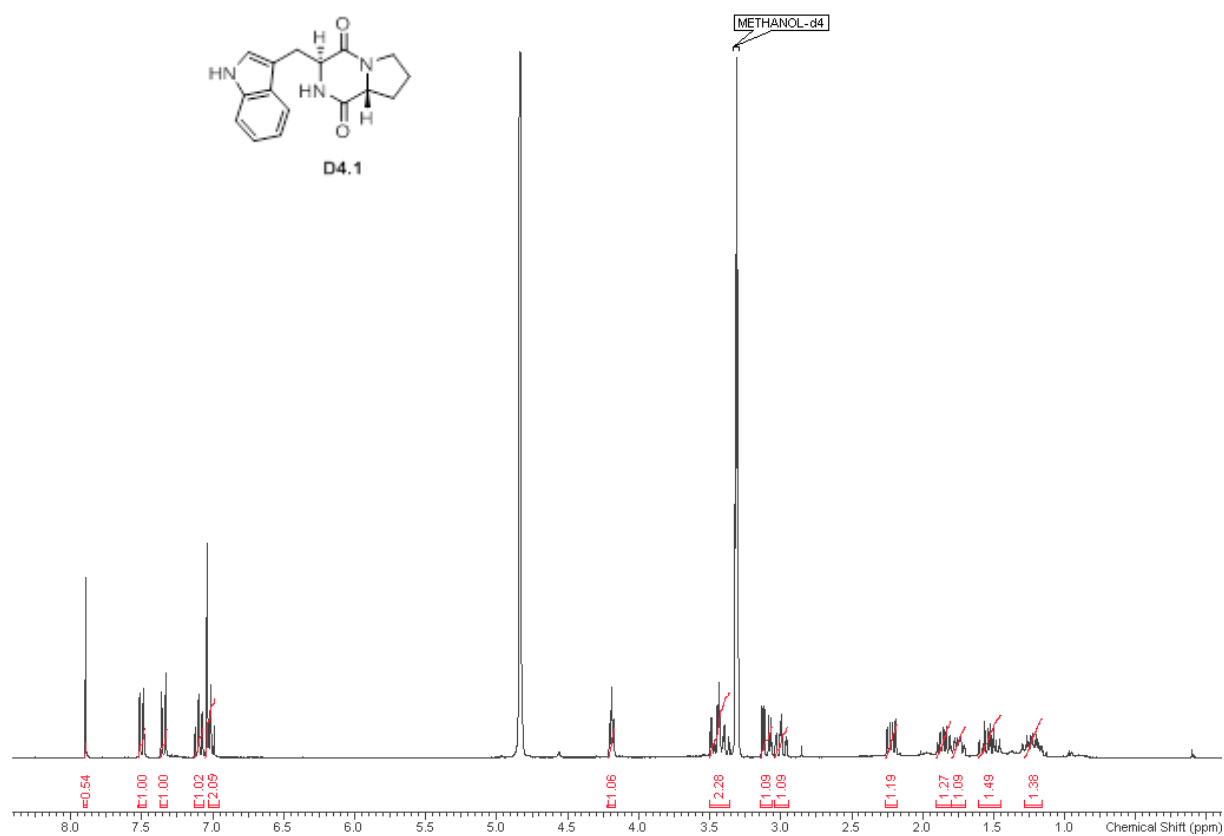
¹³C-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-L-Tyr) **D3.1** (75 MHz, CDCl₃).



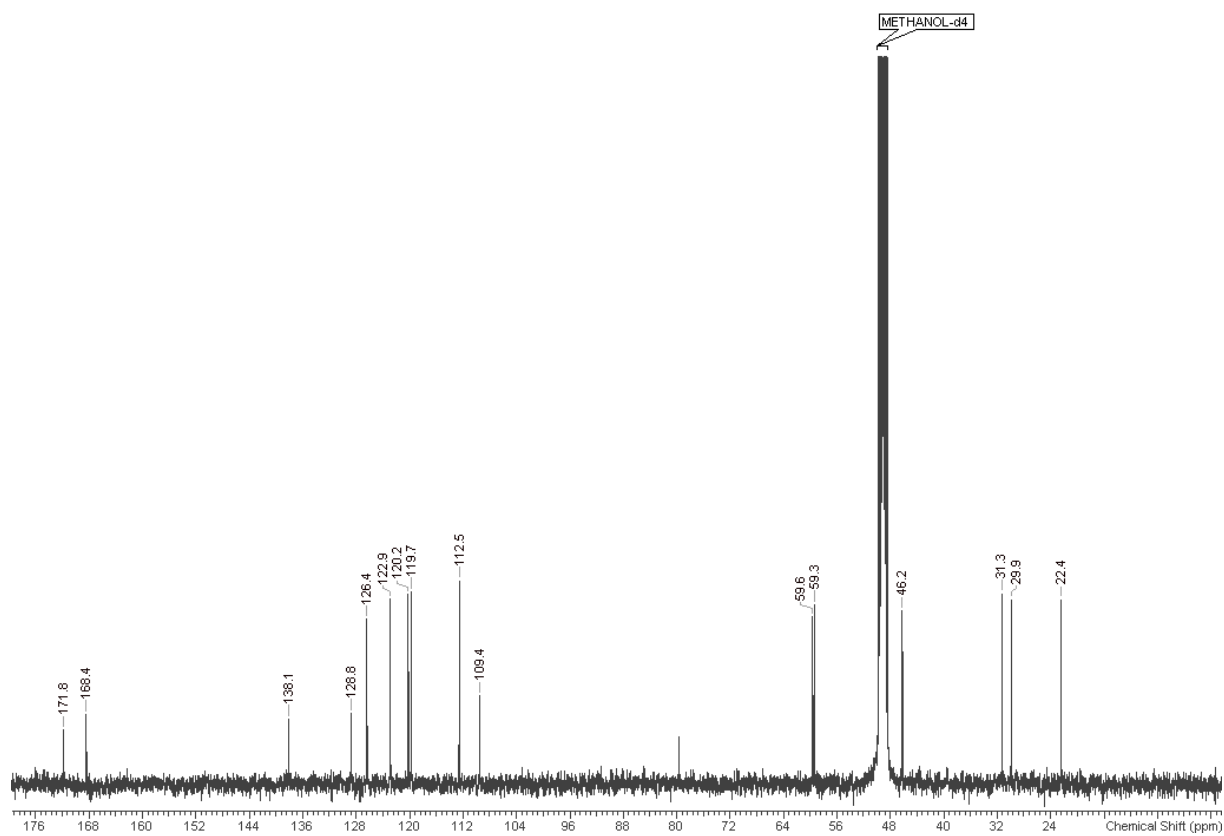
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-L-Tyr) **D3.2** (300 MHz, CD₃OD).



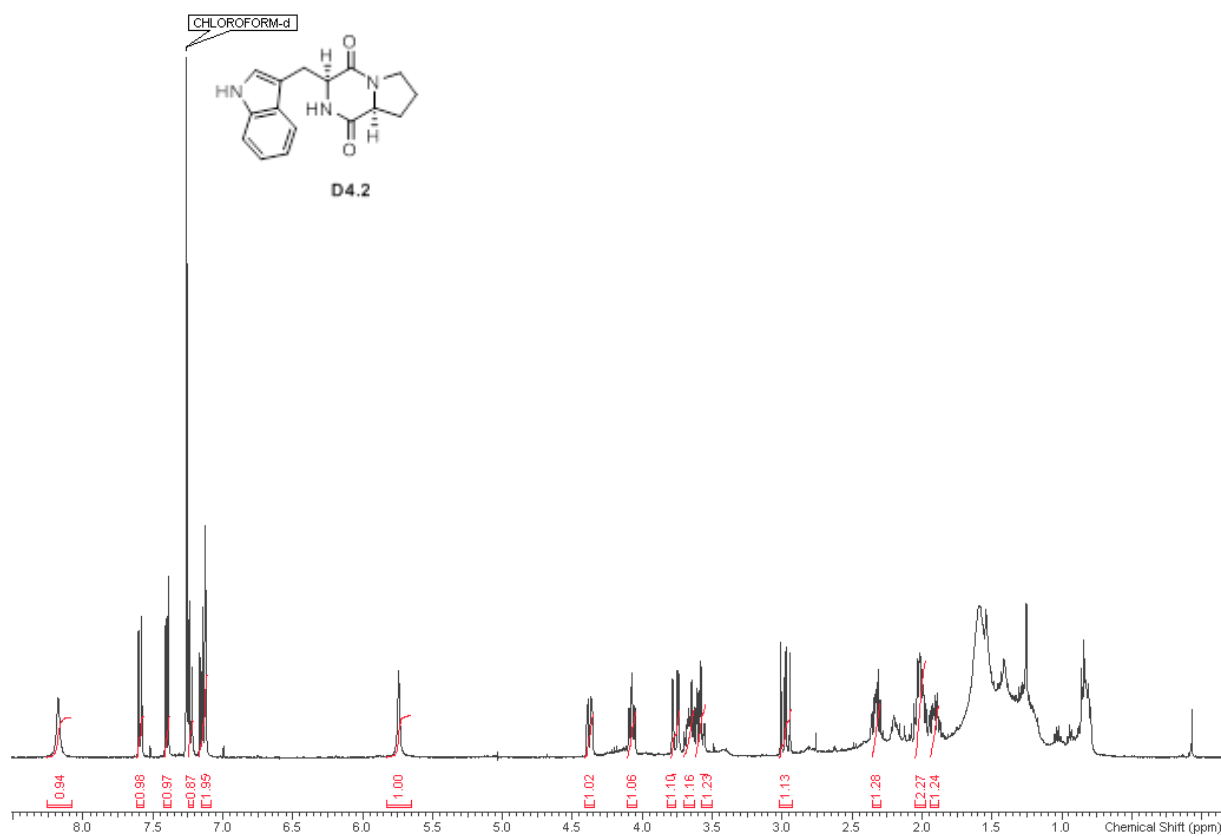
¹³C-NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-L-Tyr) **D3.2** (75 MHz, CD₃OD).



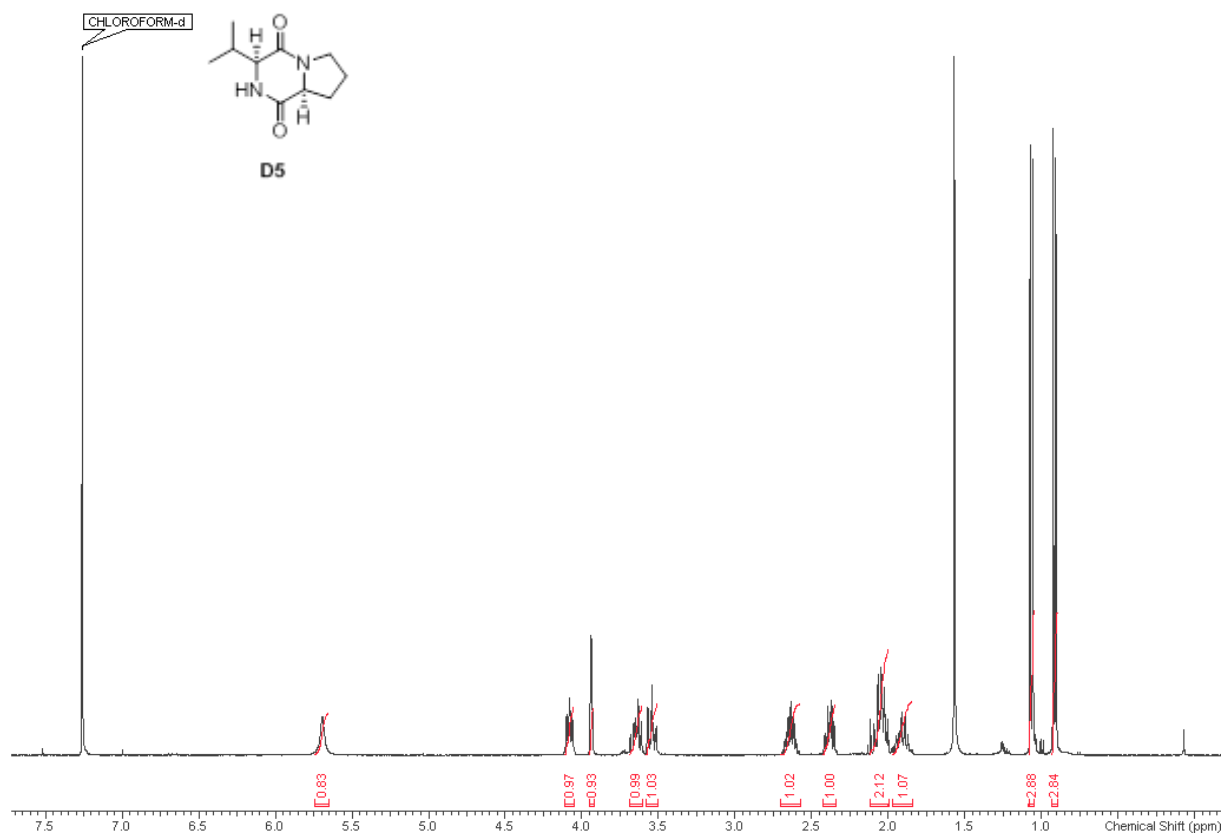
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-L-Trp) **D4.1** (300 MHz, CD₃OD).



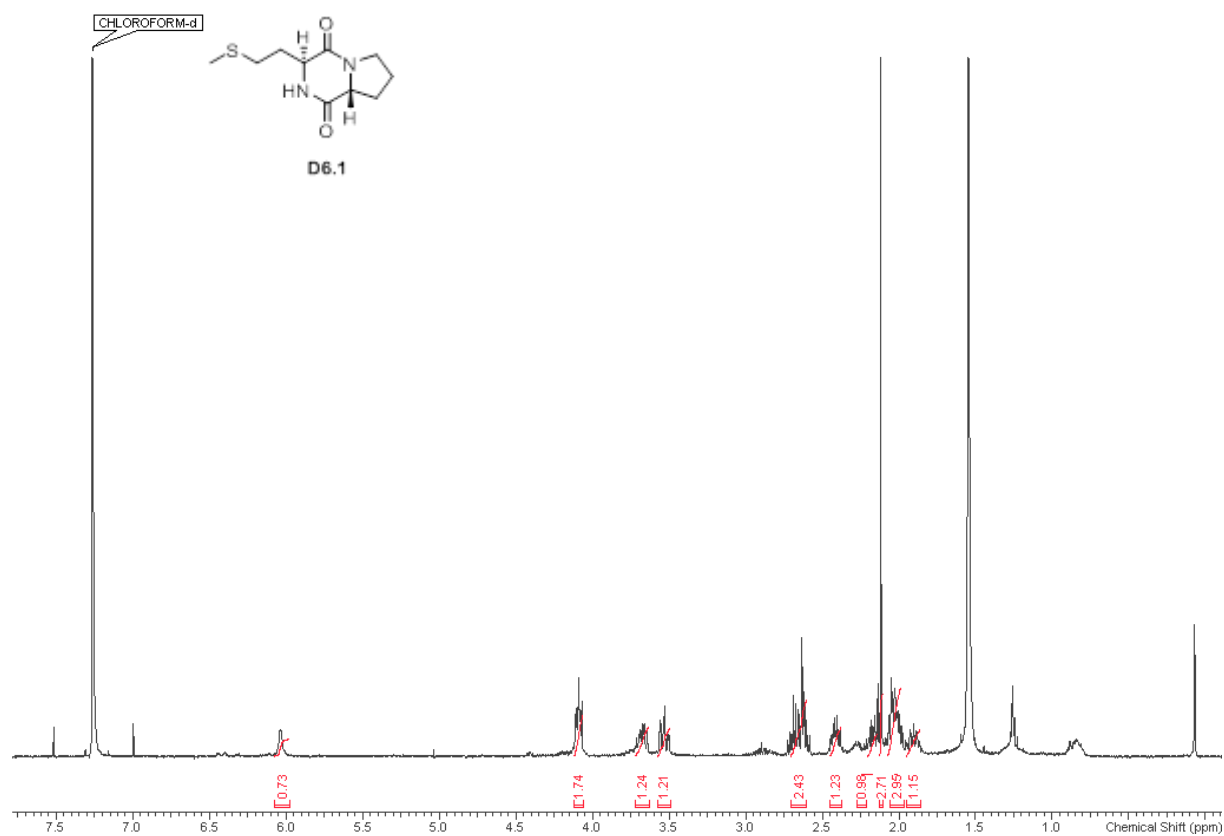
¹³C-NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-L-Trp) **D4.1** (75 MHz, CD₃OD).



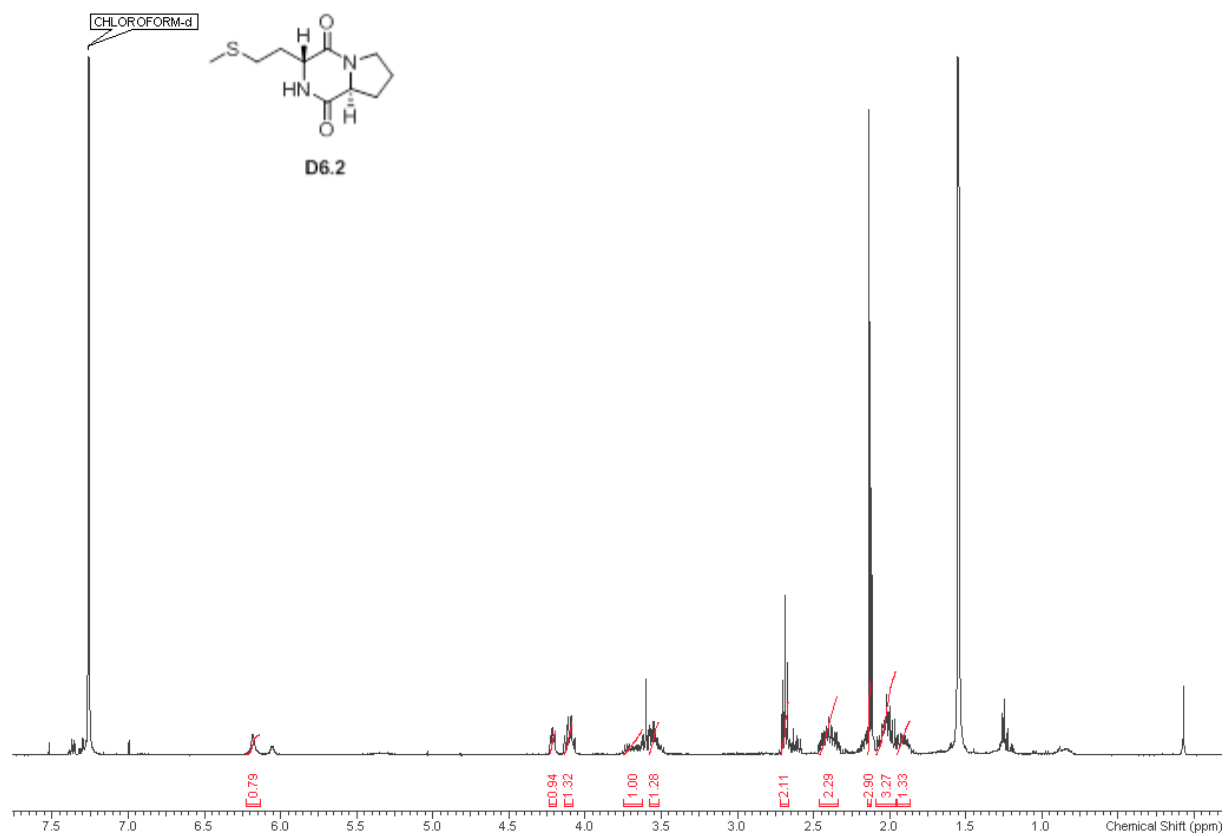
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-L-Trp) **D4.2** (400 MHz, CDCl₃).



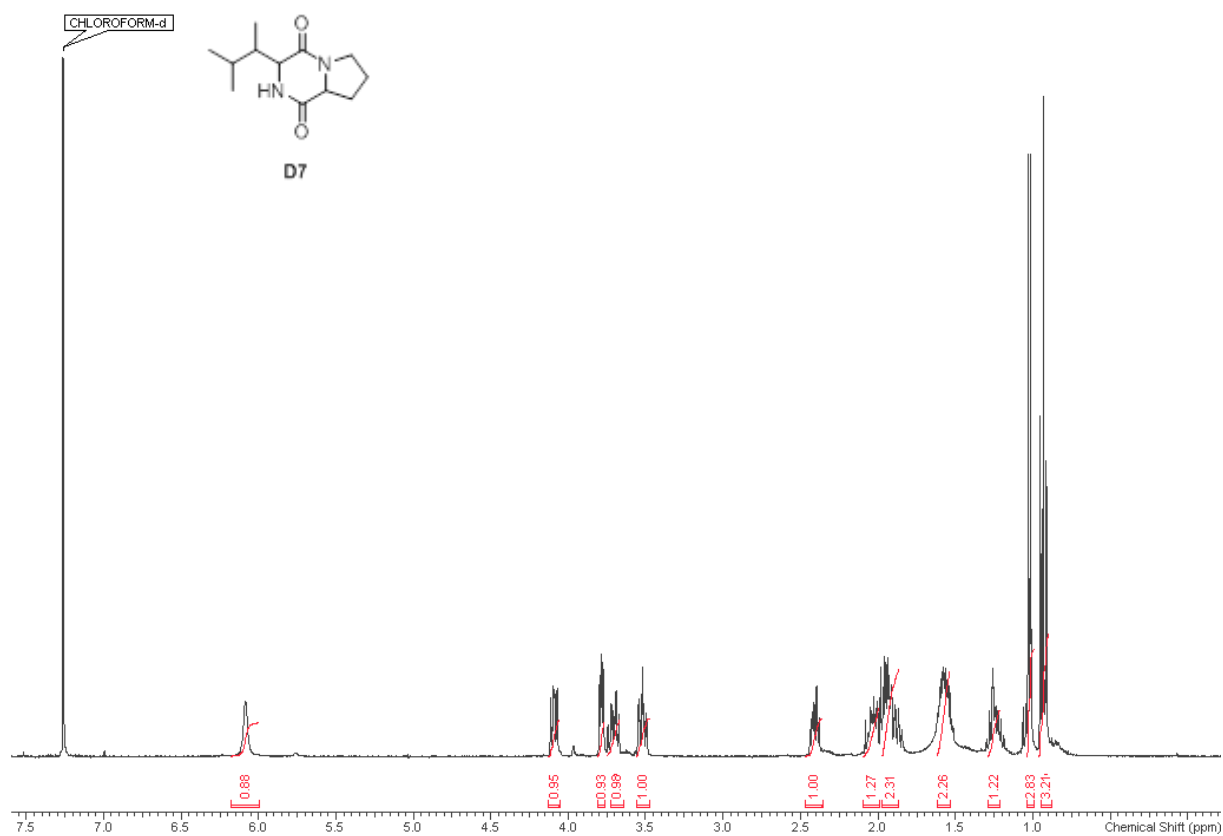
¹H-NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-L-Val) **D5** (400 MHz, CDCl₃).



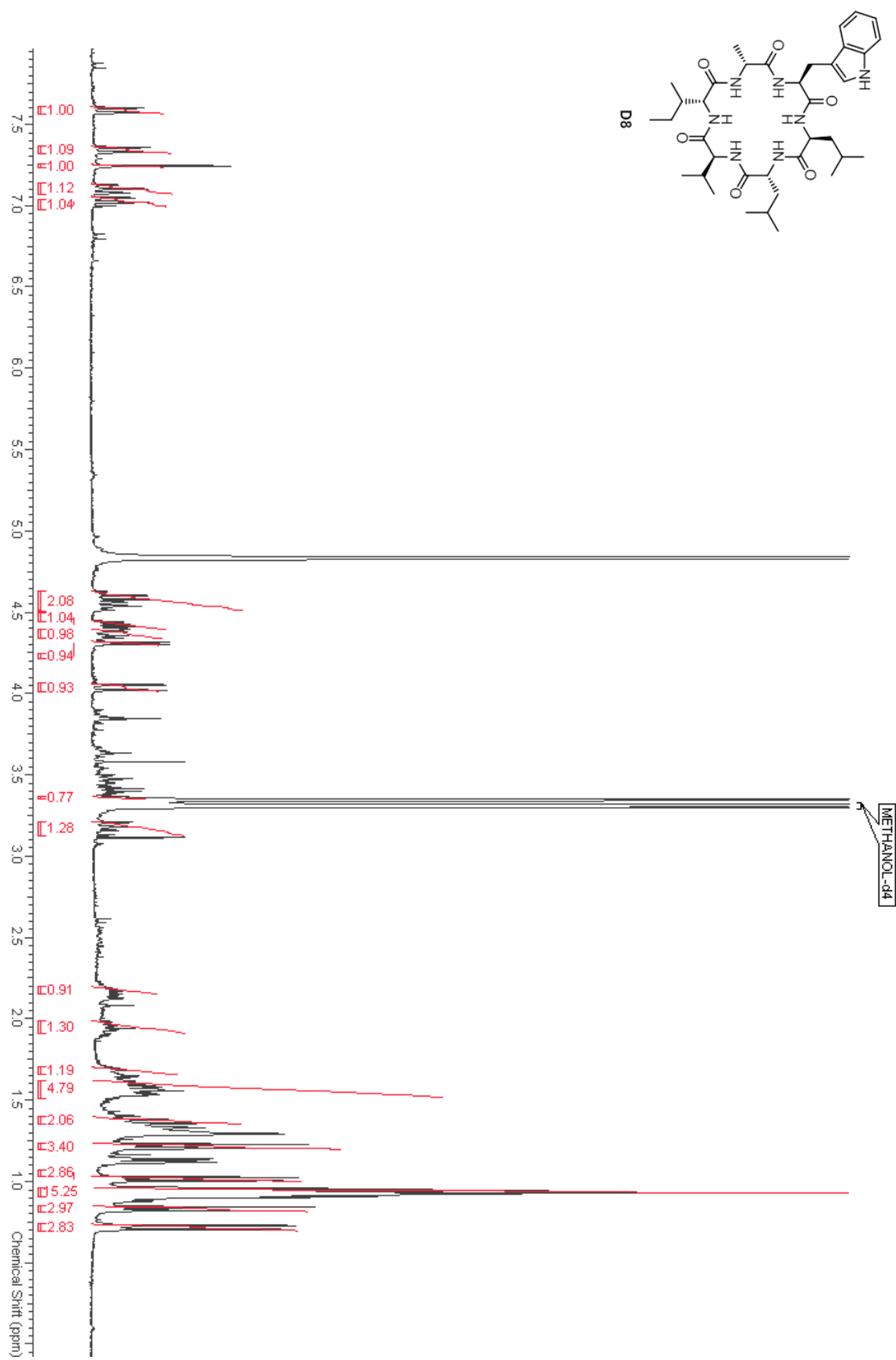
^1H -NMR-Spektrum Cyclo-(D-Pro-L-Met) **D6.1** (400 MHz, CDCl_3).

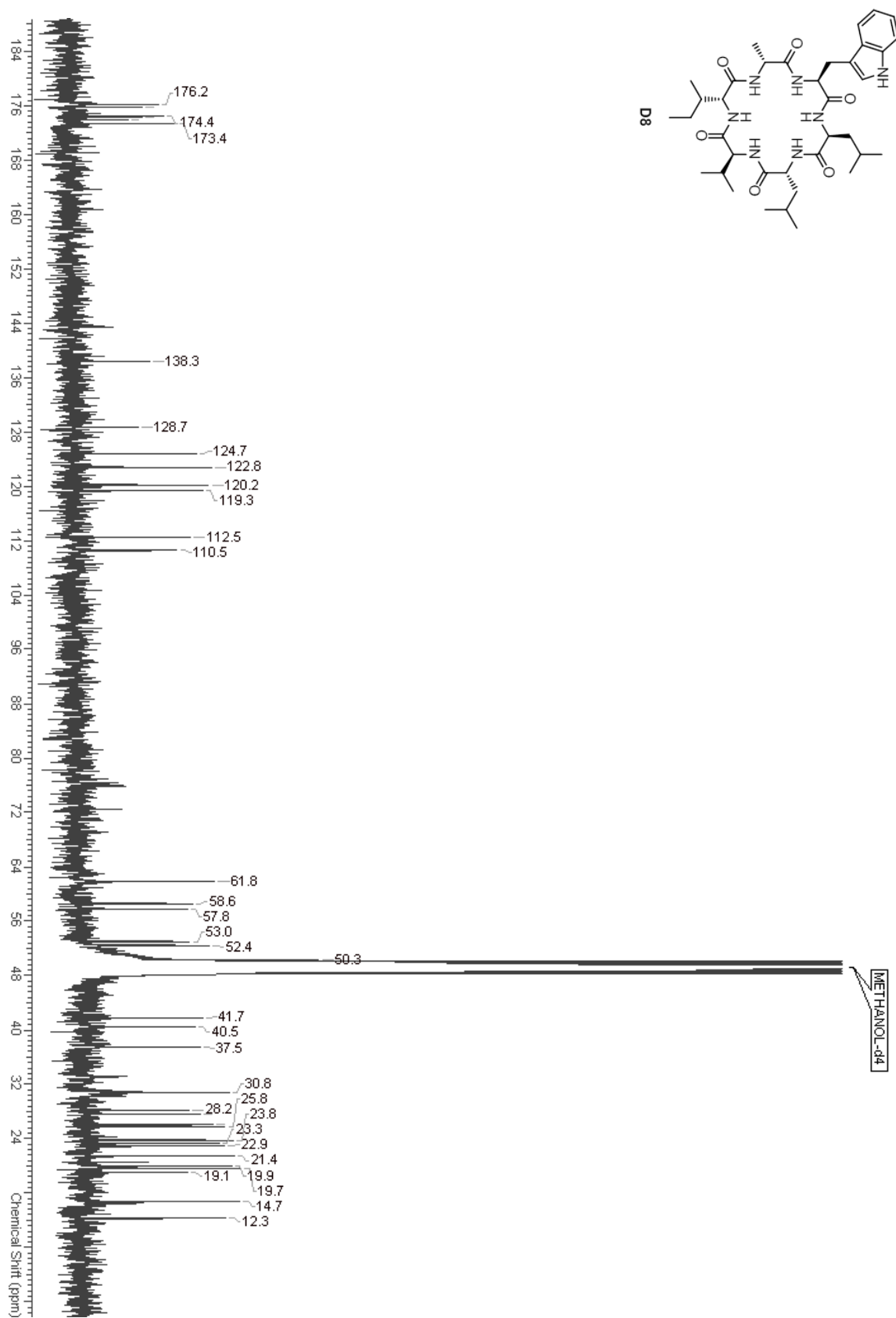


^1H -NMR-Spektrum Cyclo-(L-Pro-D-Met) **D6.2** (400 MHz, CDCl_3).



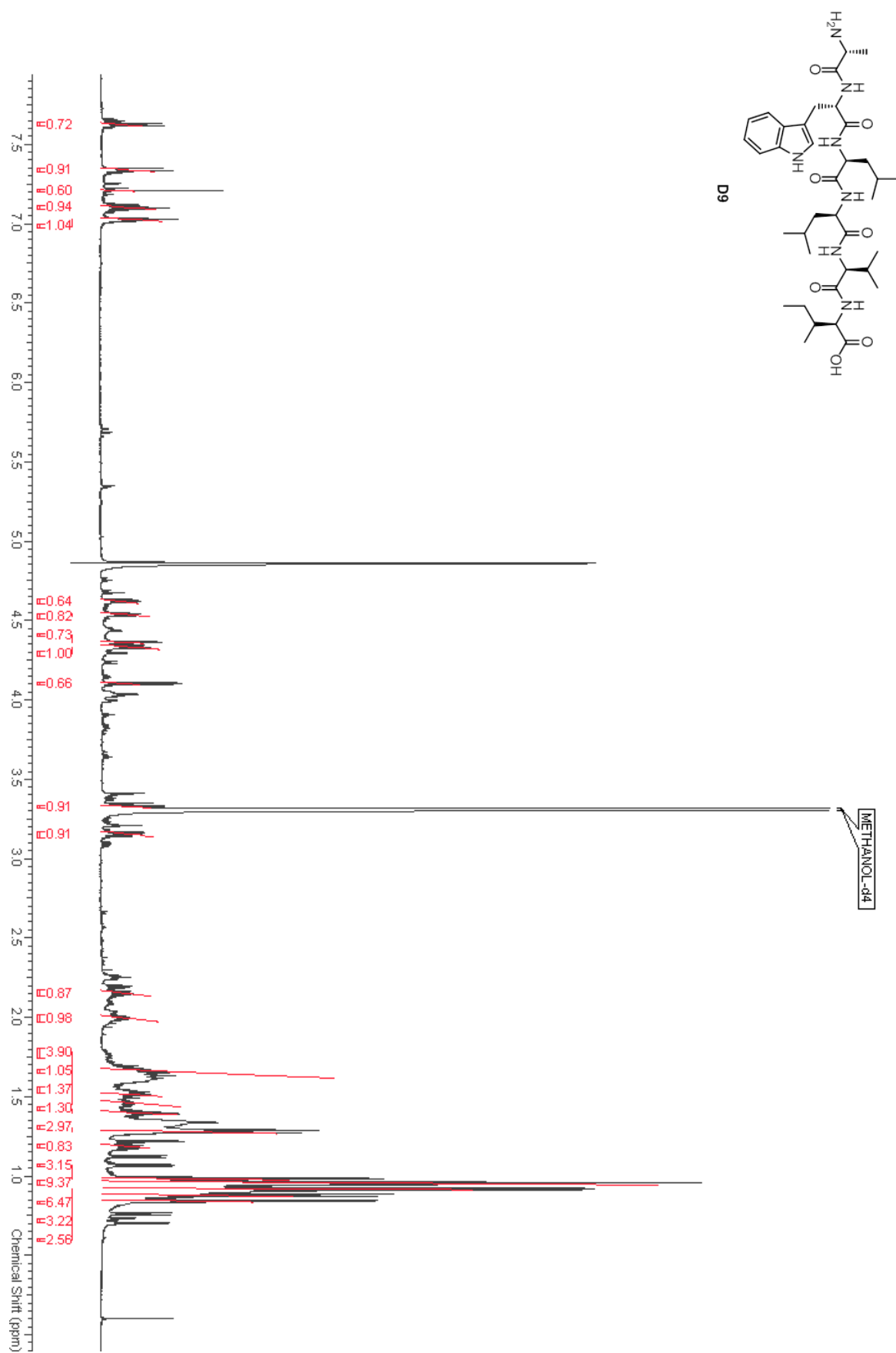
^1H -NMR-Spektrum Cyclo-(Pro-Ile) **D7** (400 MHz, CDCl_3).



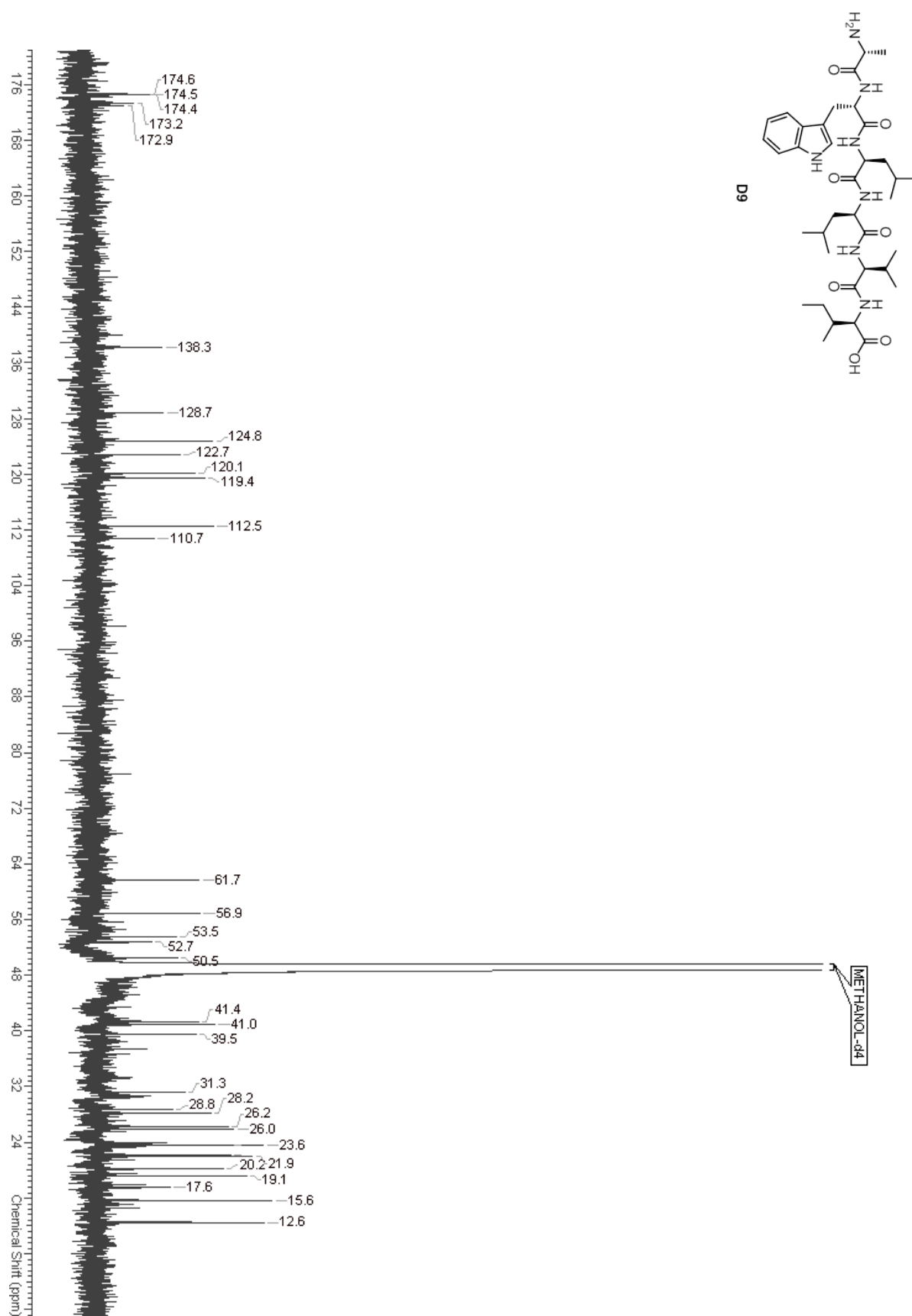


^{13}C -NMR-Spektrum Baceridin **D8** (75 MHz, CD_3OD).

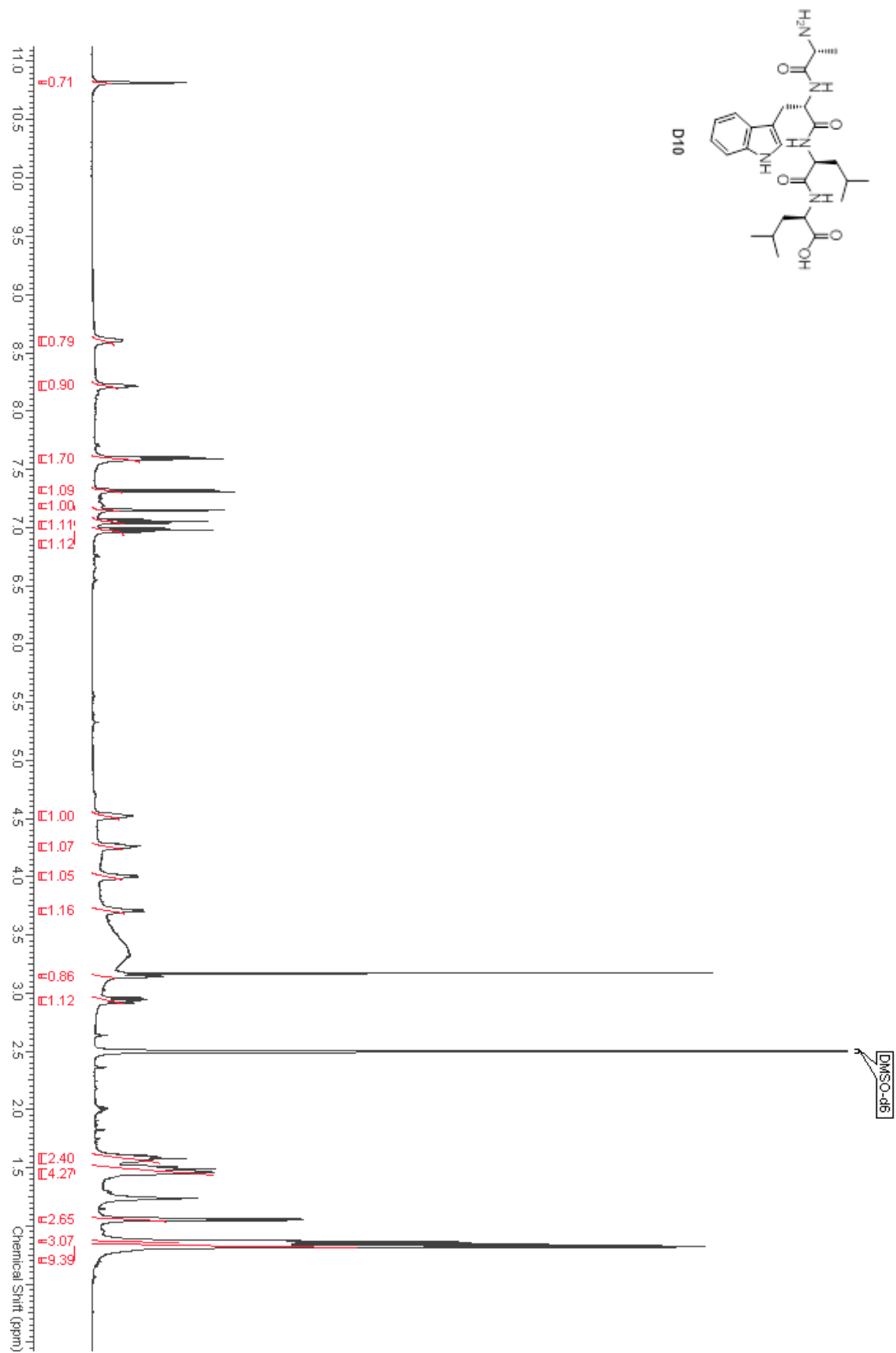




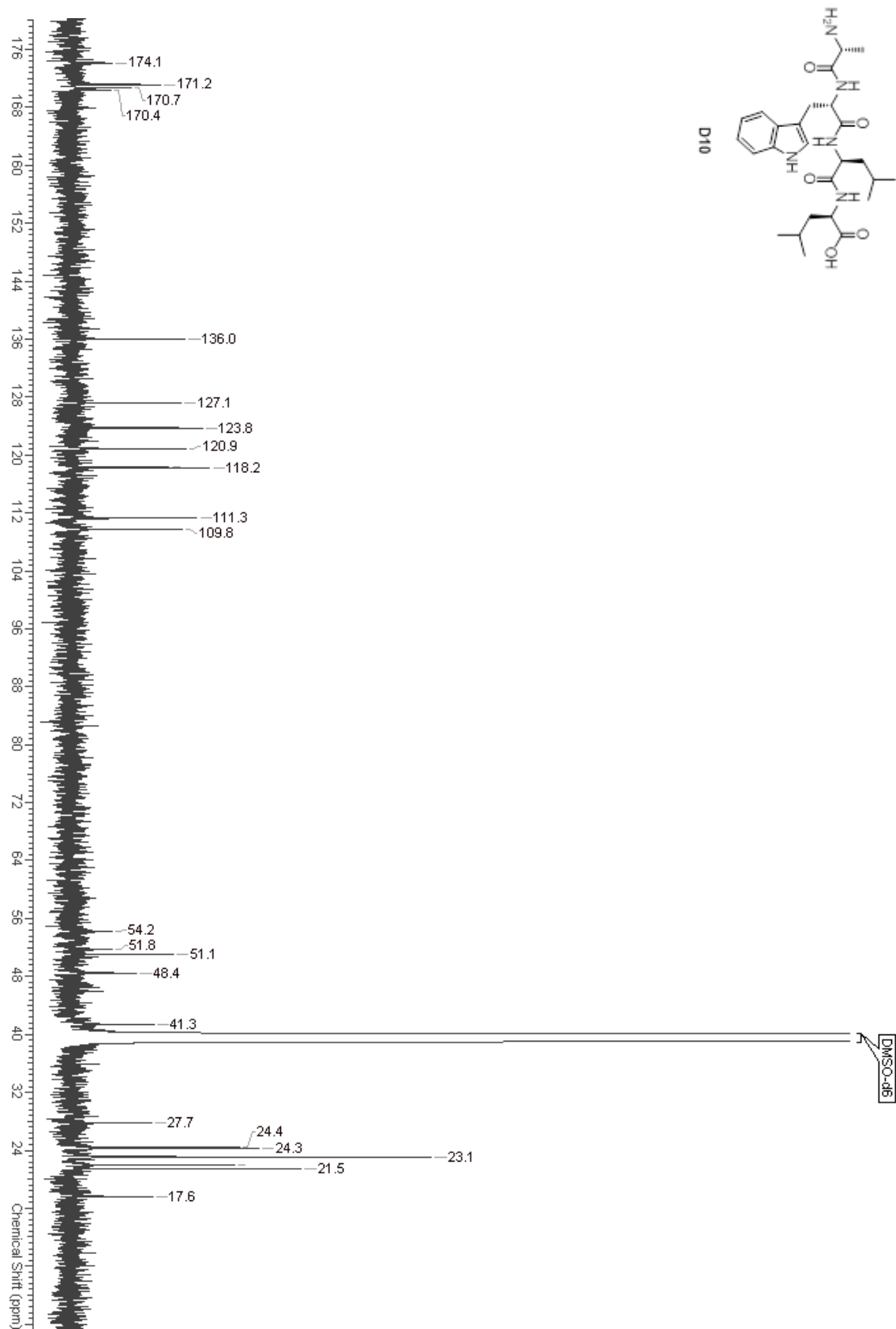
^1H -NMR-Spektrum Azyklisches Baceridin **D9** (700 MHz, CD_3OD).



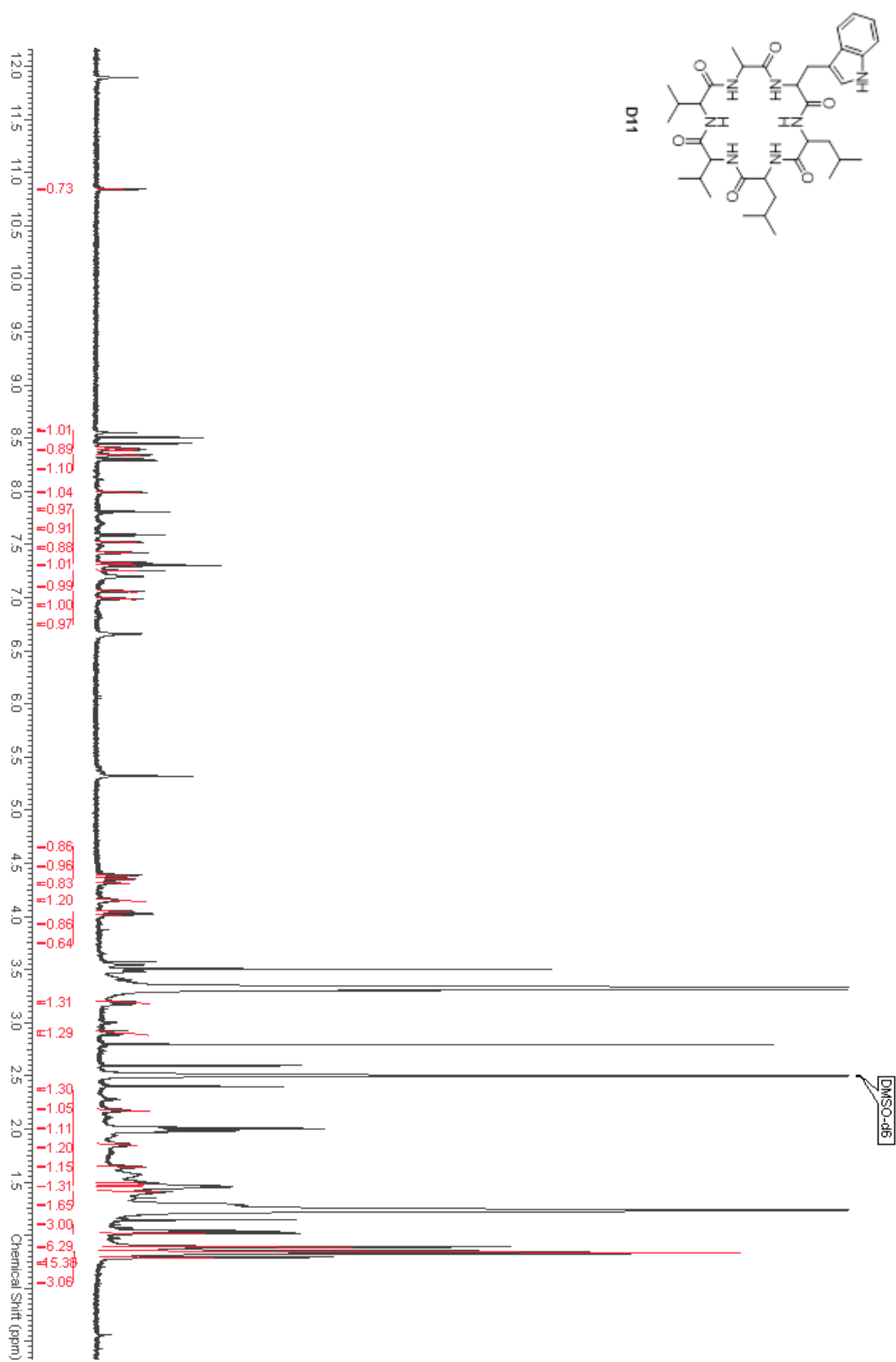
¹³C-NMR-Spektrum Azyklisches Baceridin **D9** (176 MHz, CD₃OD).



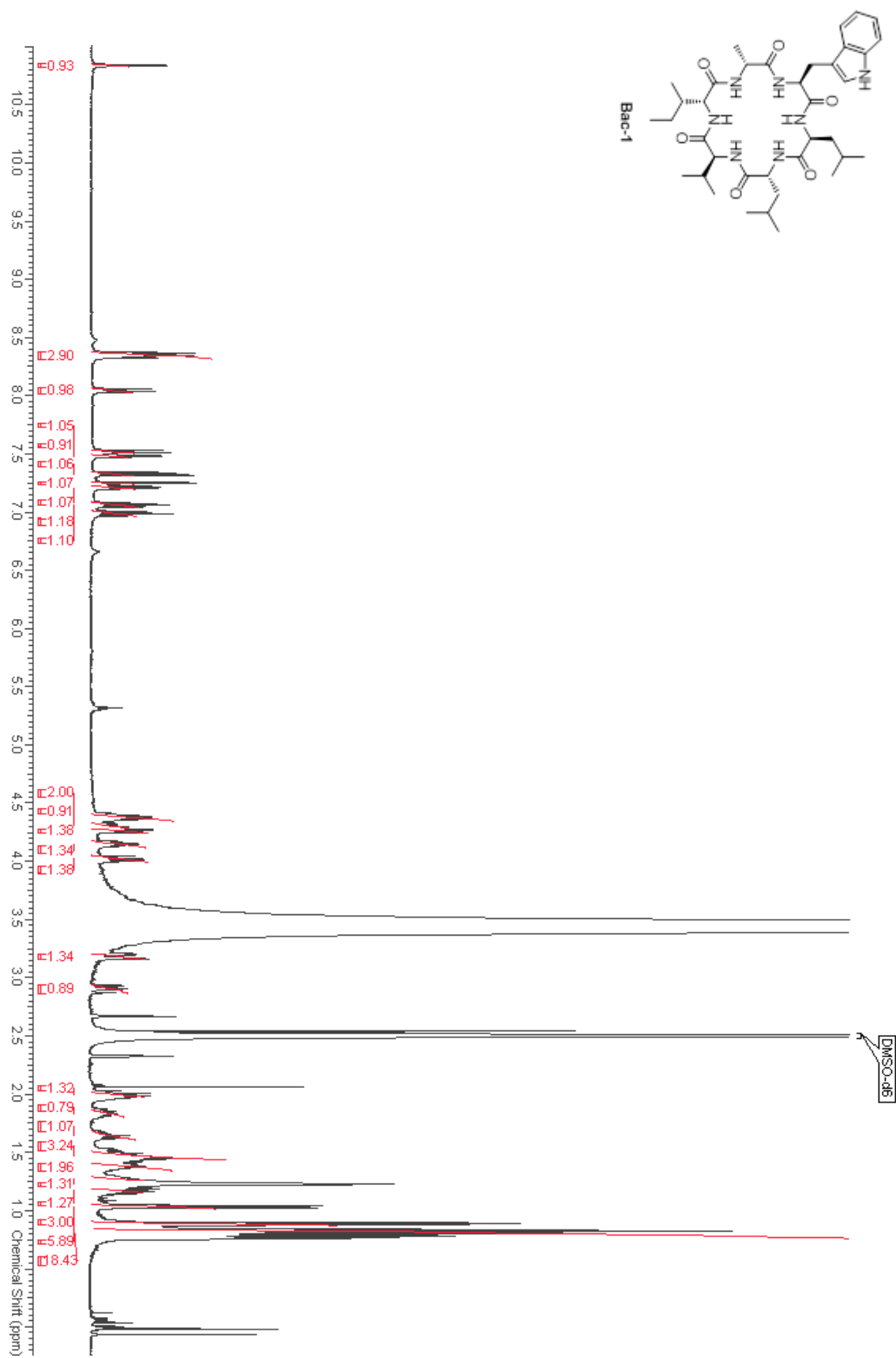
^1H -NMR-Spektrum Tetrapeptid **D10** (500 MHz, DMSO-d_6).

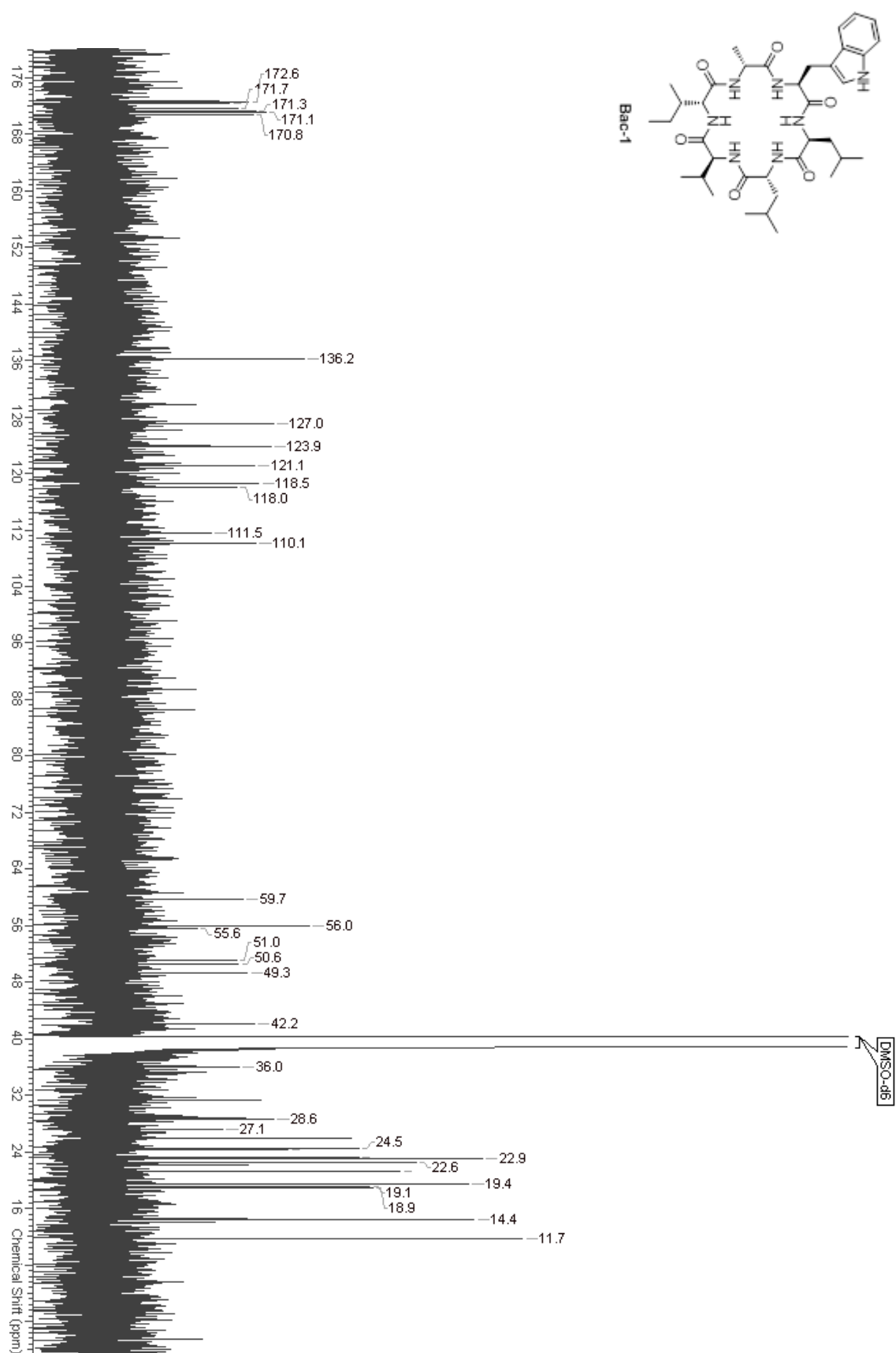


^{13}C -NMR-Spektrum Tetrapeptid **D9** (126 MHz, DMSO-d_6).

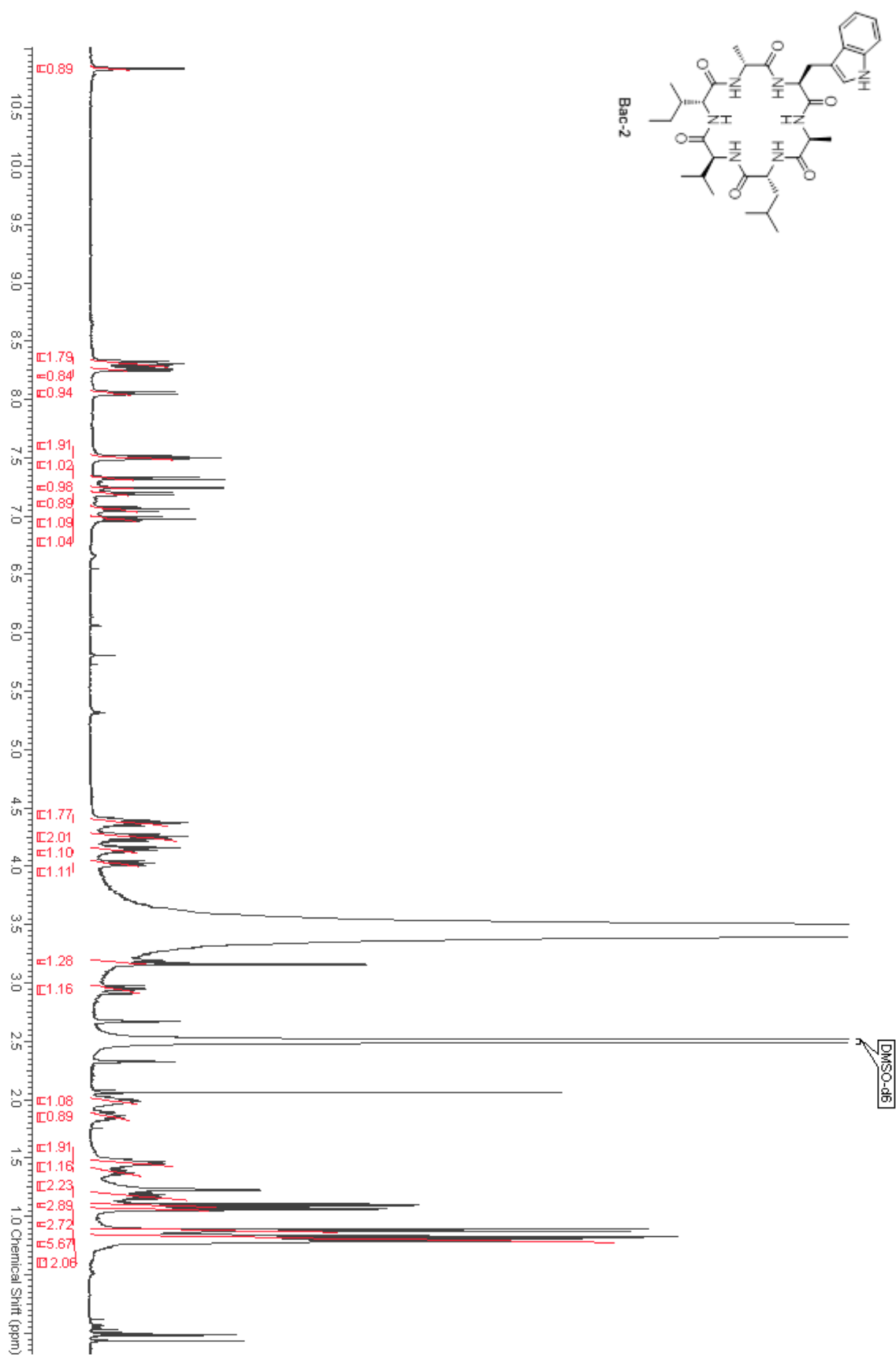


¹H-NMR-Spektrum Zyklisches Hexapeptid **D11** (700 MHz, DMSO-d₆).

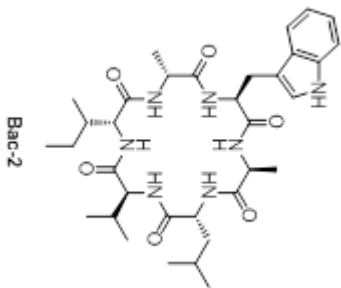
 ^1H -NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-1** (400 MHz, DMSO-d_6).

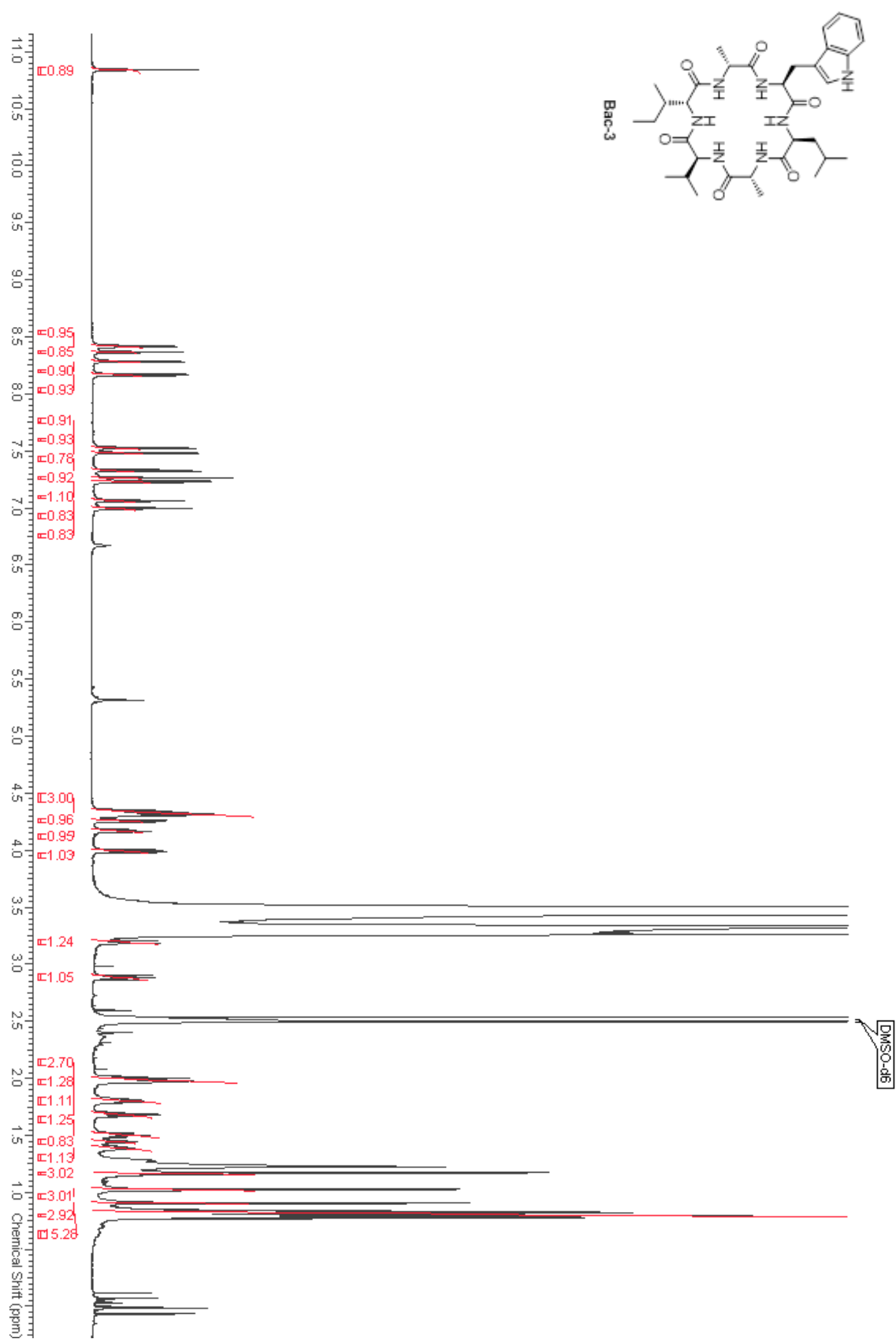


¹³C-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-1** (101 MHz, DMSO-d₆).

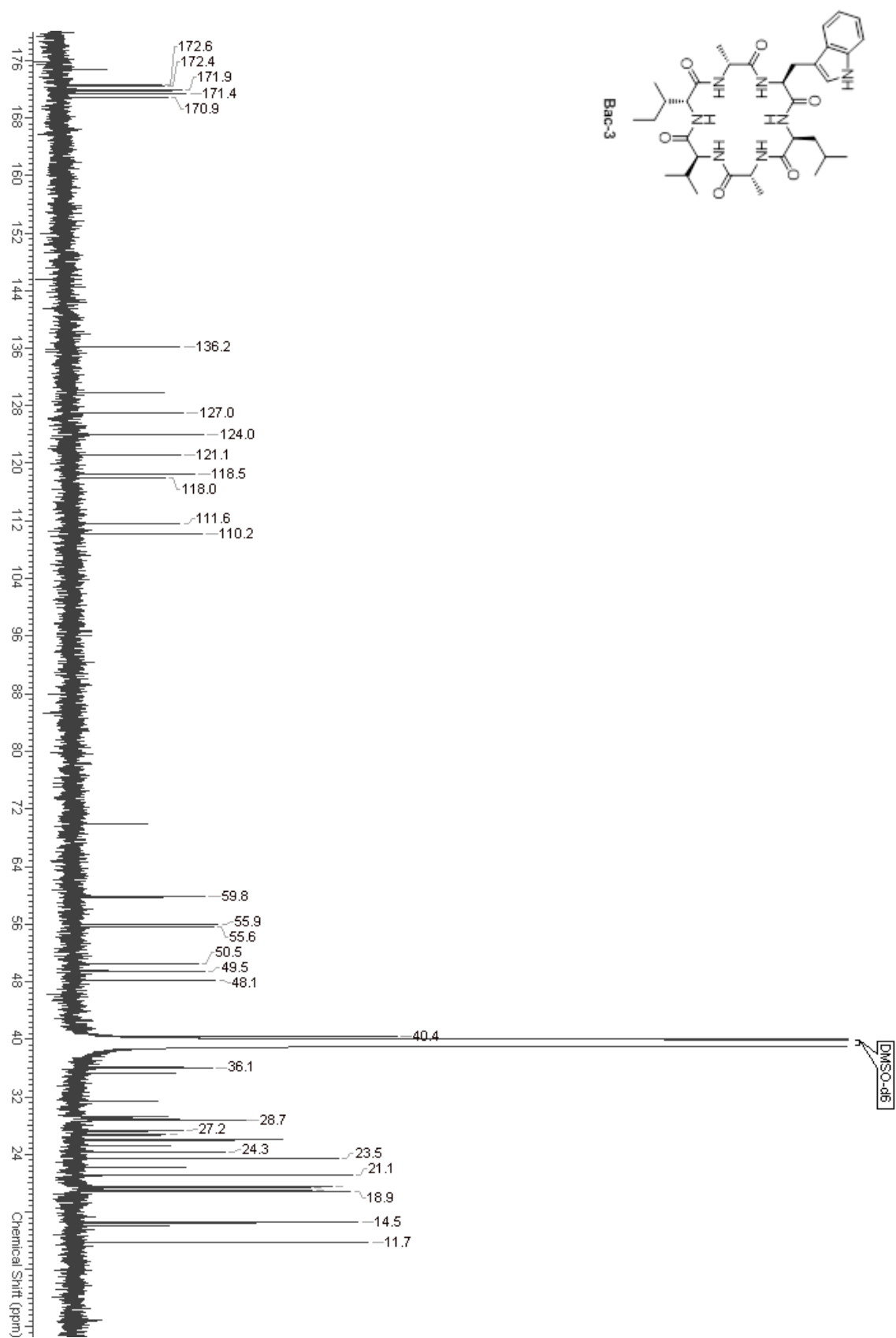


^1H -NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-2** (400 MHz, DMSO-d_6).

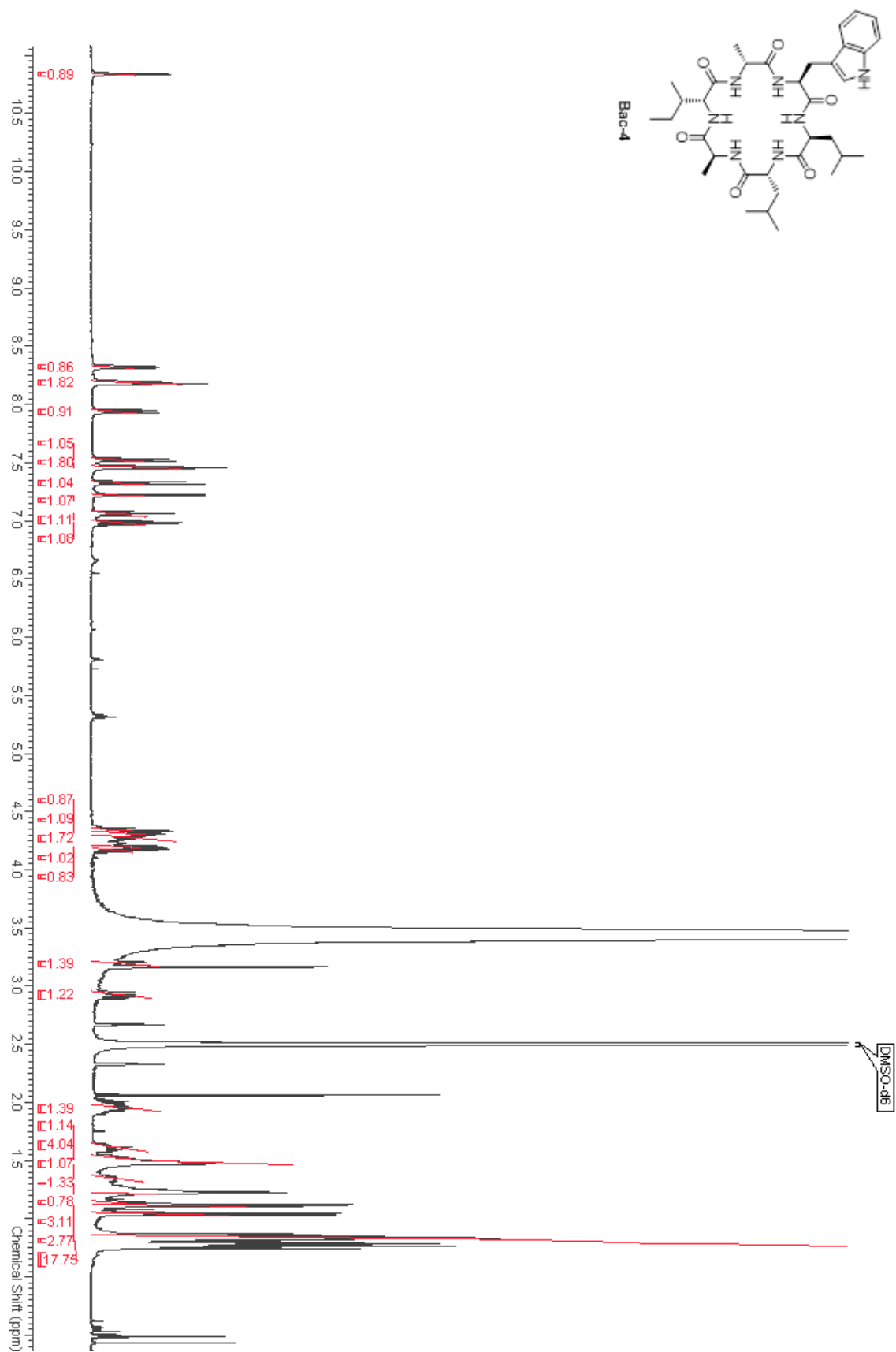




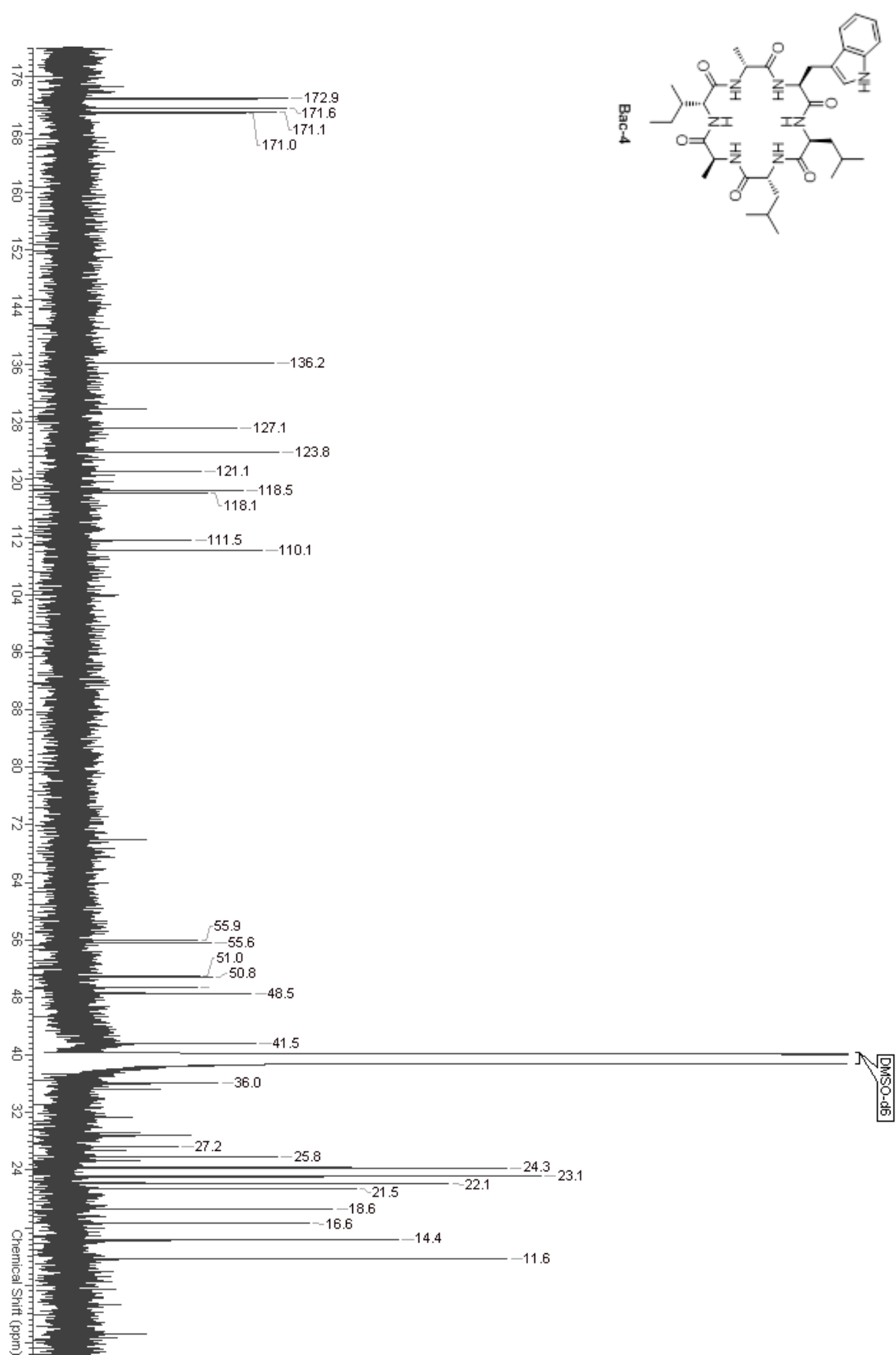
¹H-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-3** (700 MHz, DMSO-d₆).



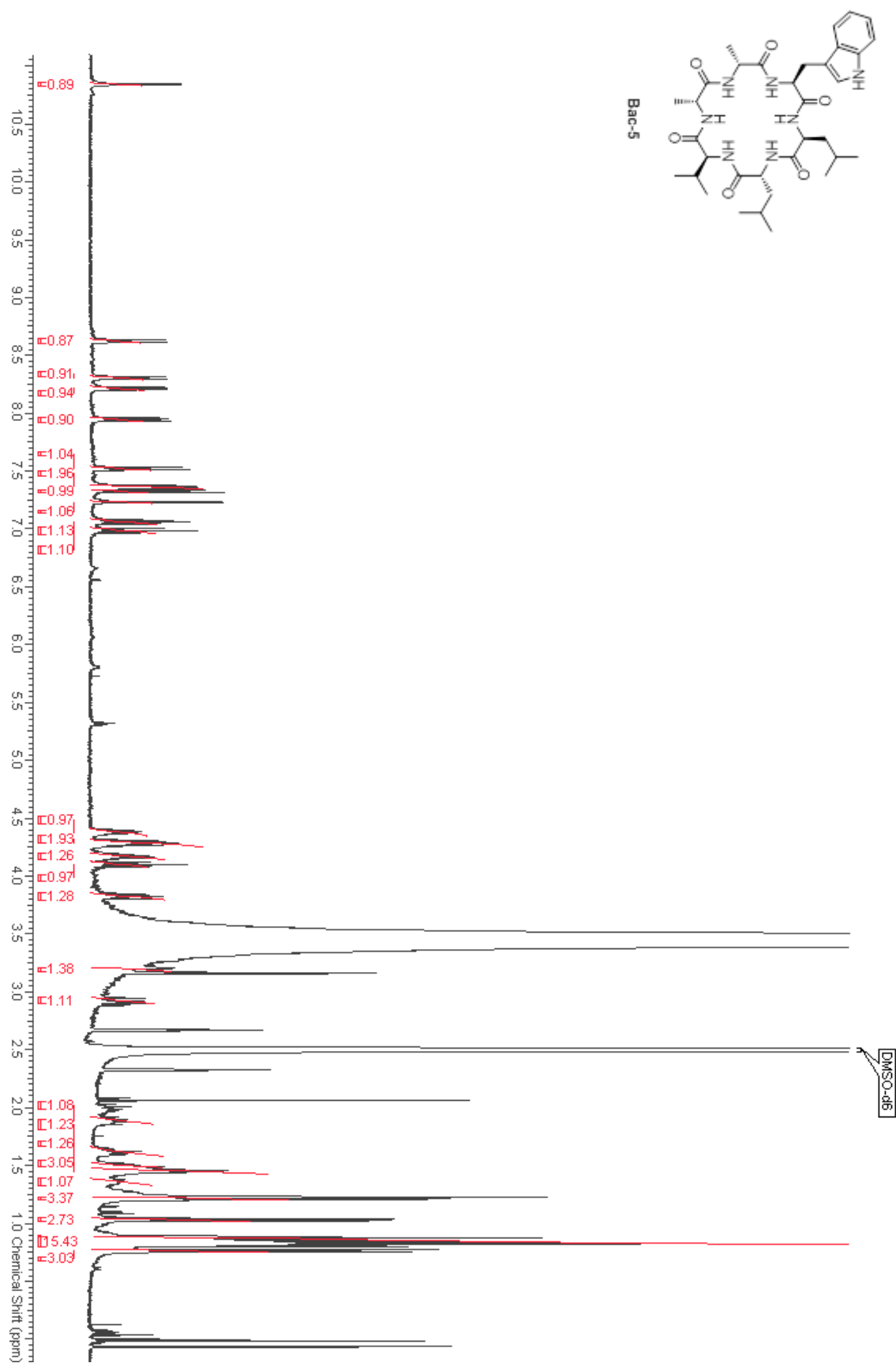
¹³C-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-3** (176 MHz, DMSO-d₆).



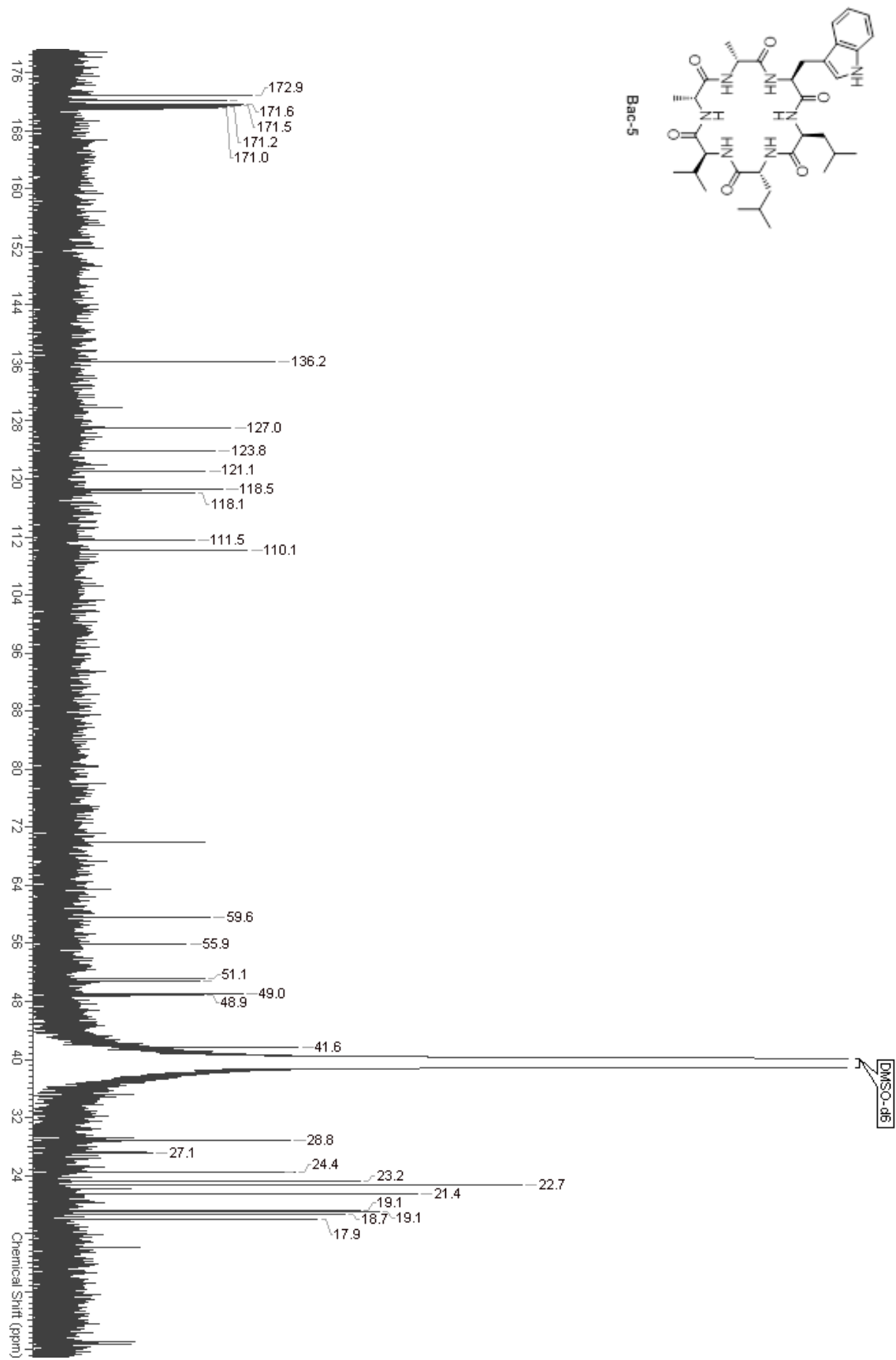
¹H-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-4** (400 MHz, DMSO-d₆).



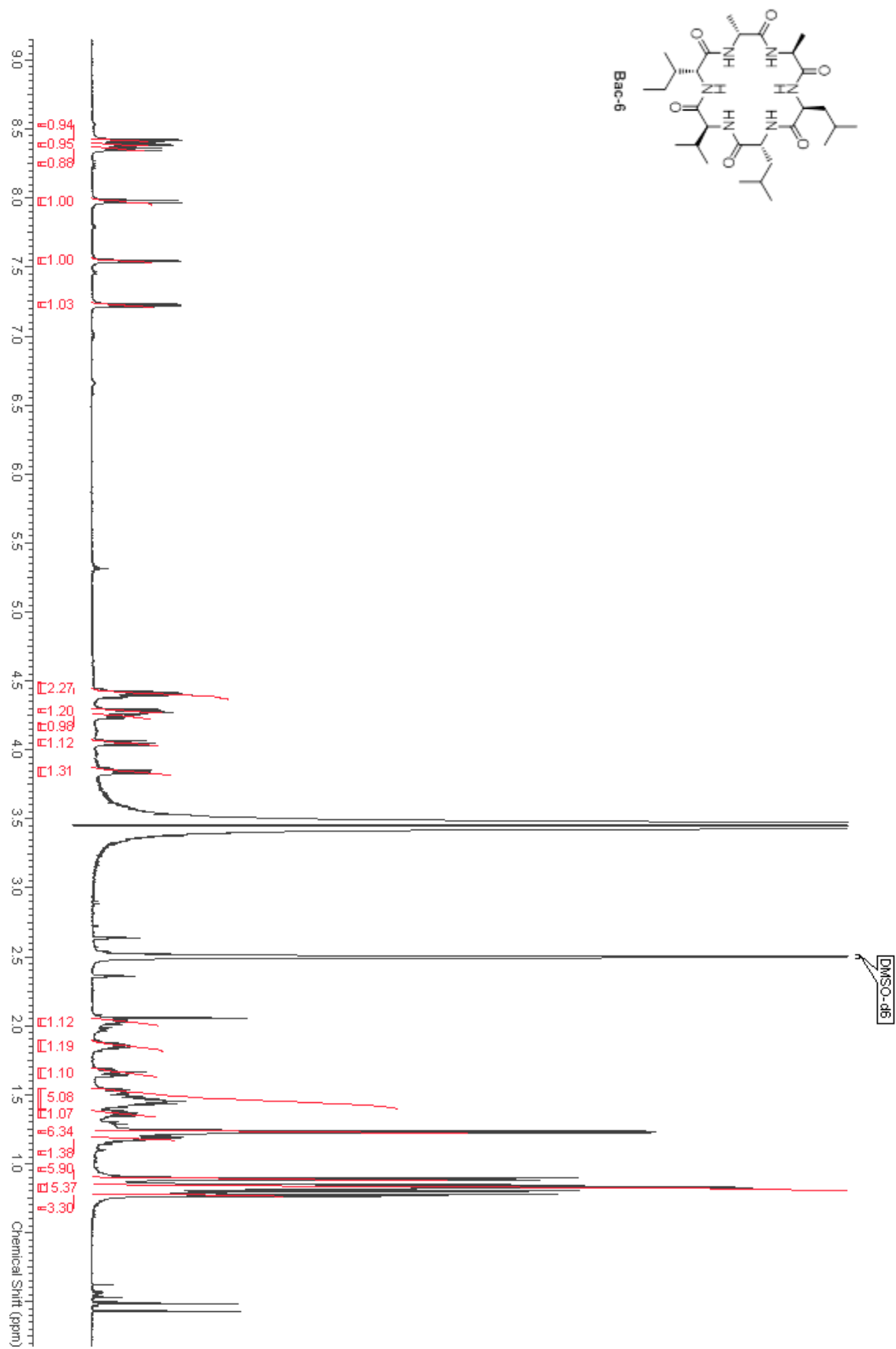
¹³C-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-4** (101 MHz, DMSO-d₆).



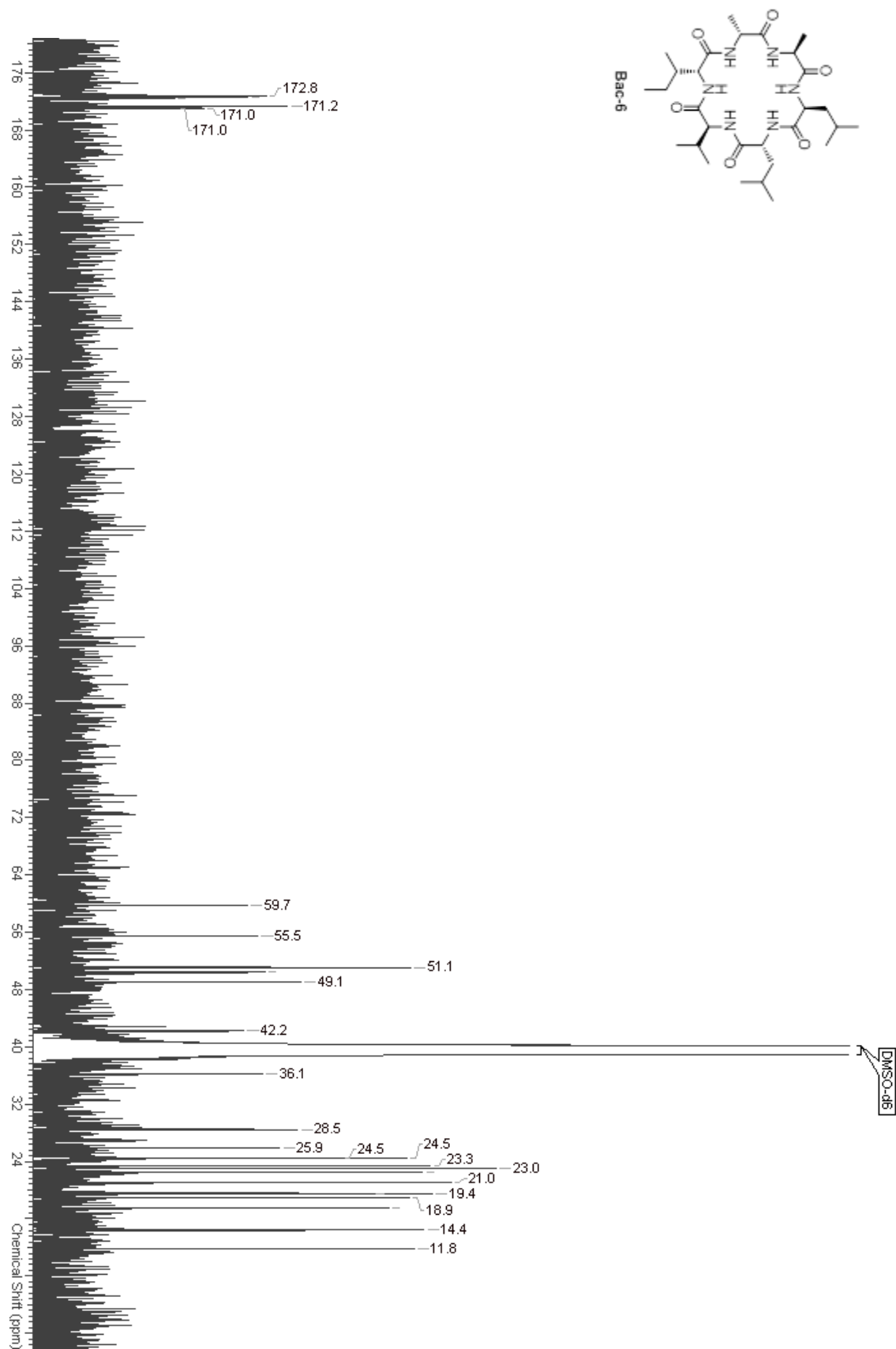
¹H-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-5** (400 MHz, DMSO-d₆).



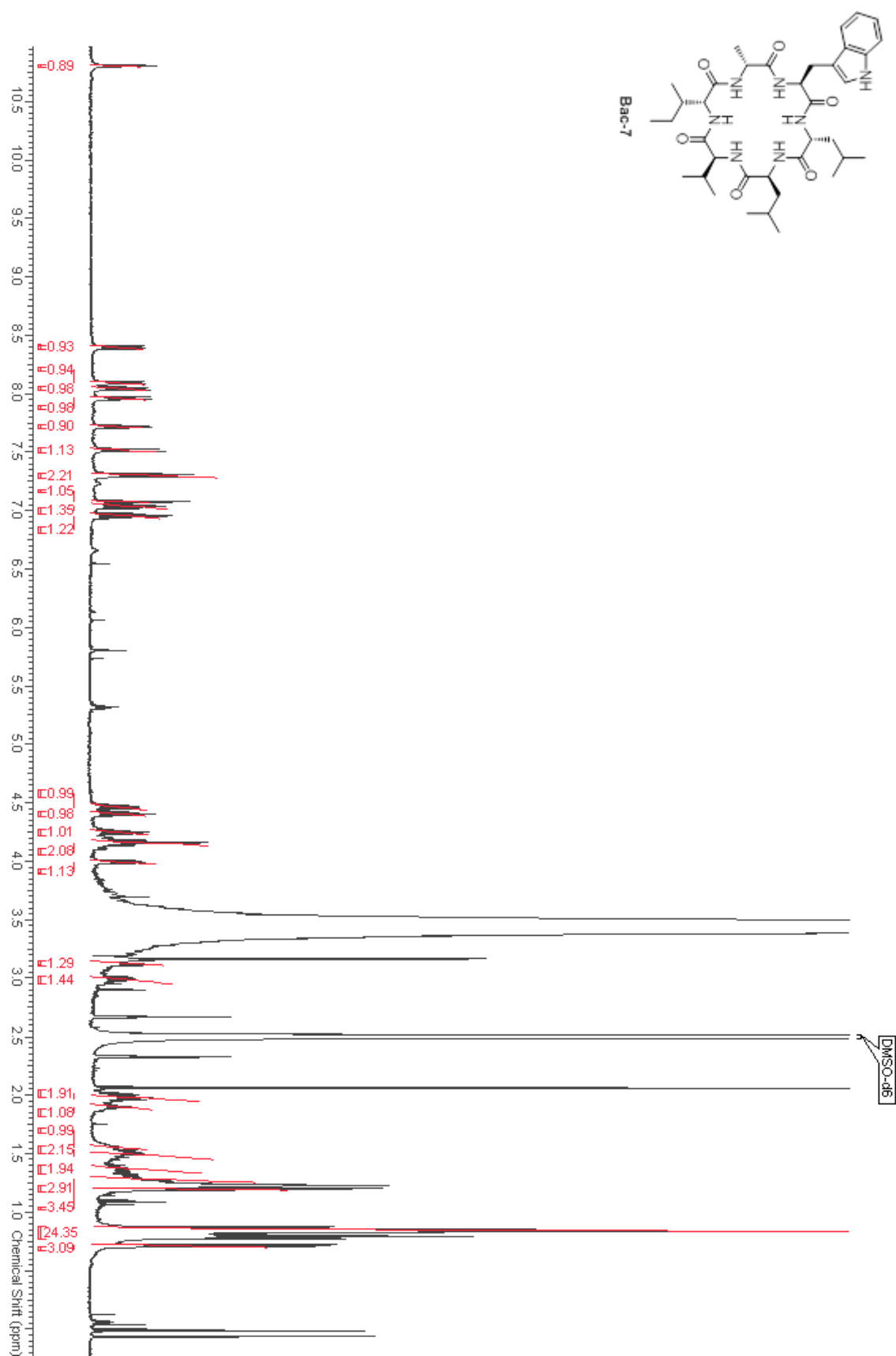
¹³C-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-5** (101 MHz, DMSO-d₆).



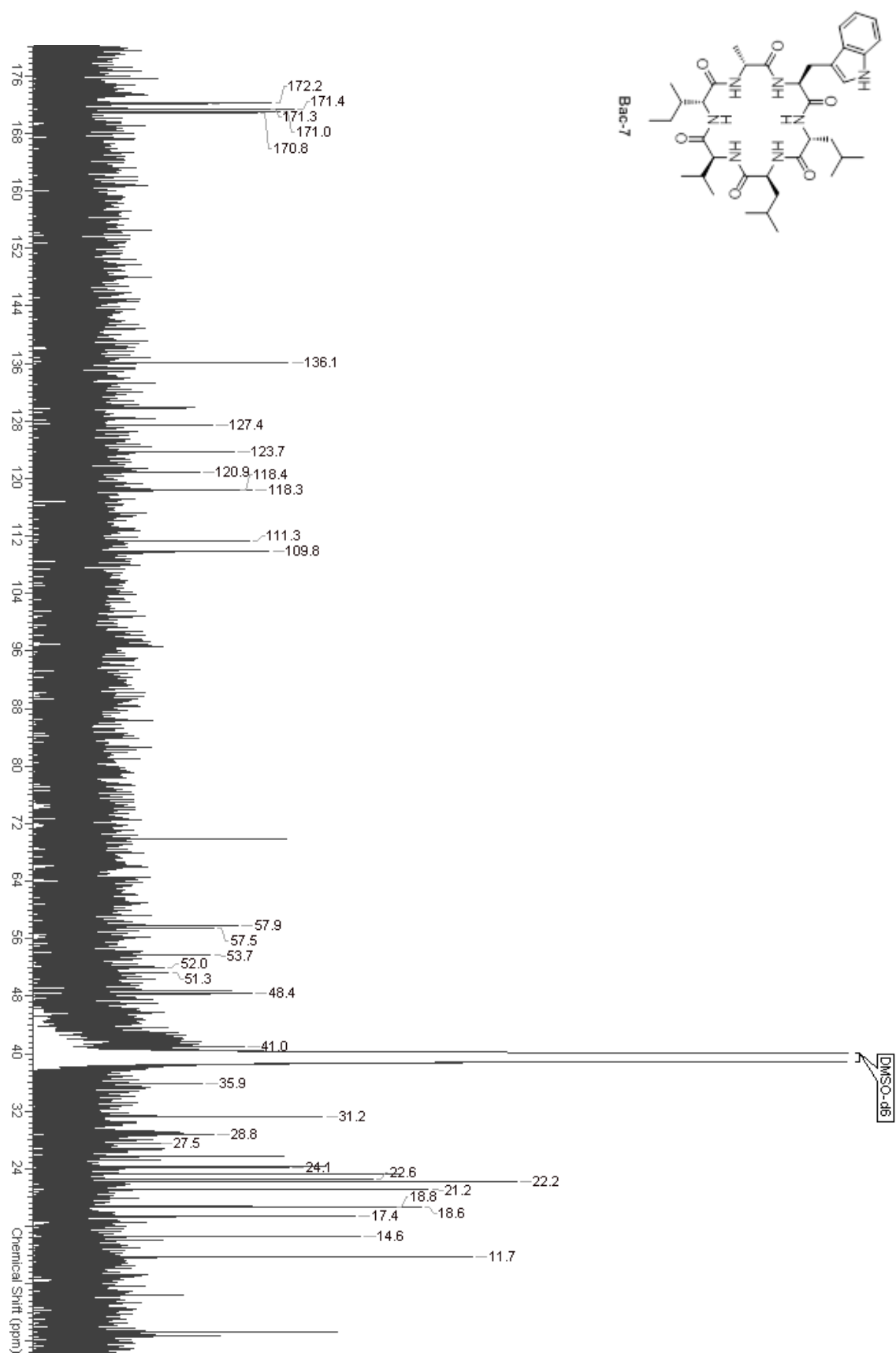
¹H-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-6** (500 MHz, DMSO-d₆).



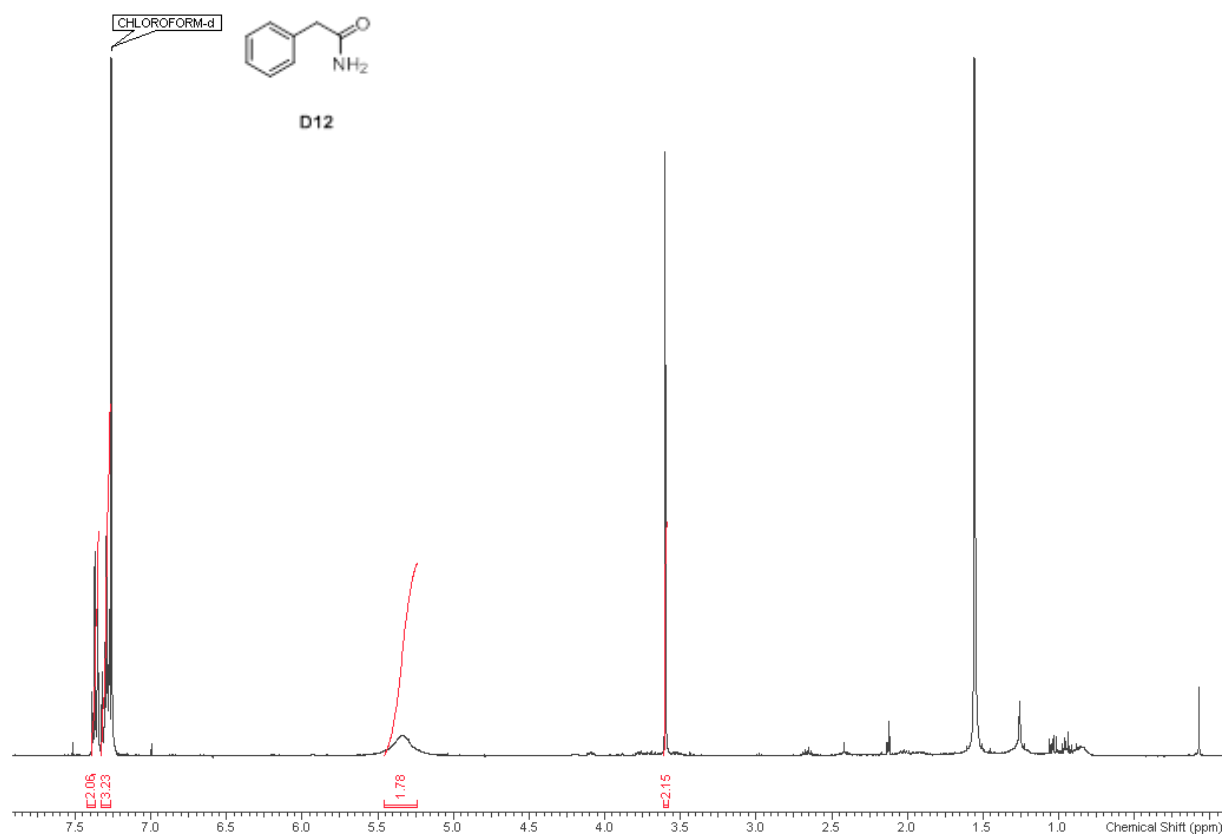
¹³C-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-6** (126 MHz, DMSO-d₆).



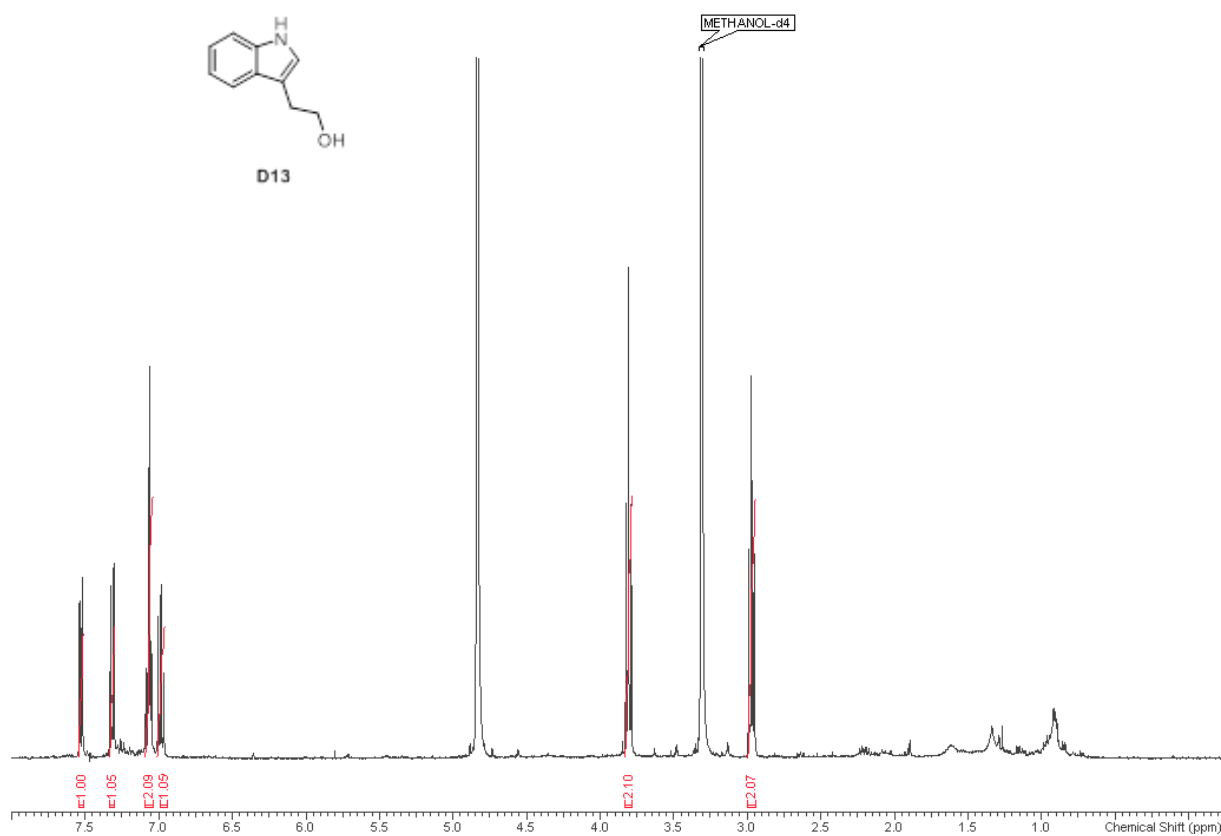
^1H -NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-7** (400 MHz, DMSO-d_6).



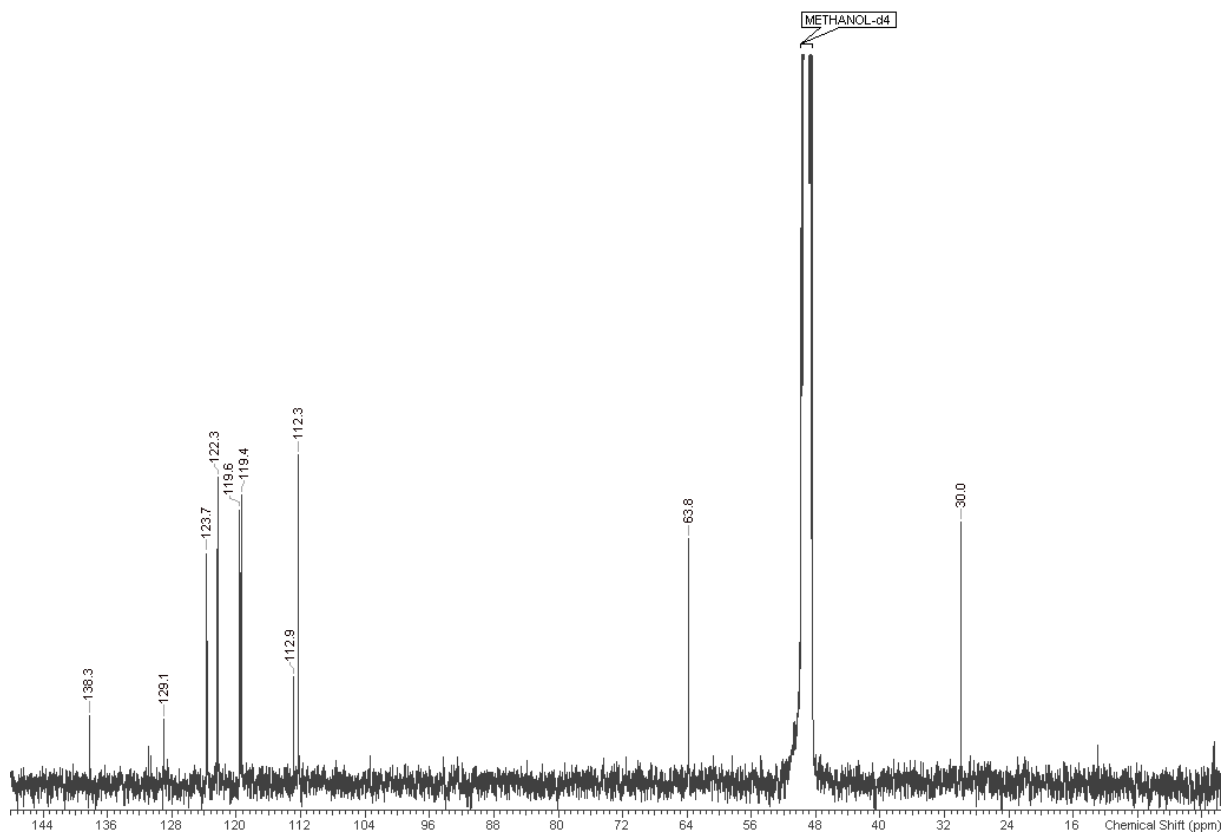
¹³C-NMR-Spektrum Hexapeptid **Bac-7** (101 MHz, DMSO-d₆).



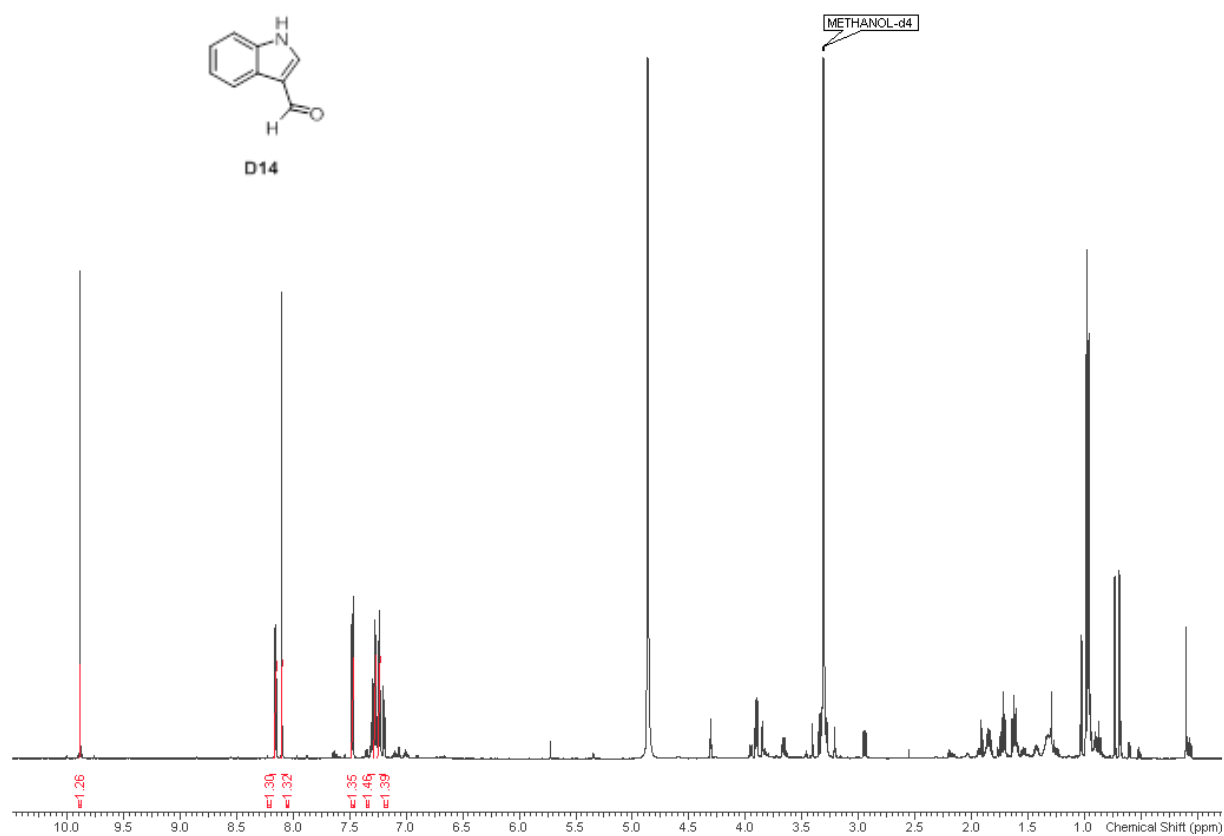
^1H -NMR-Spektrum 2-Phenylacetamid **D12** (400 MHz, CDCl_3).



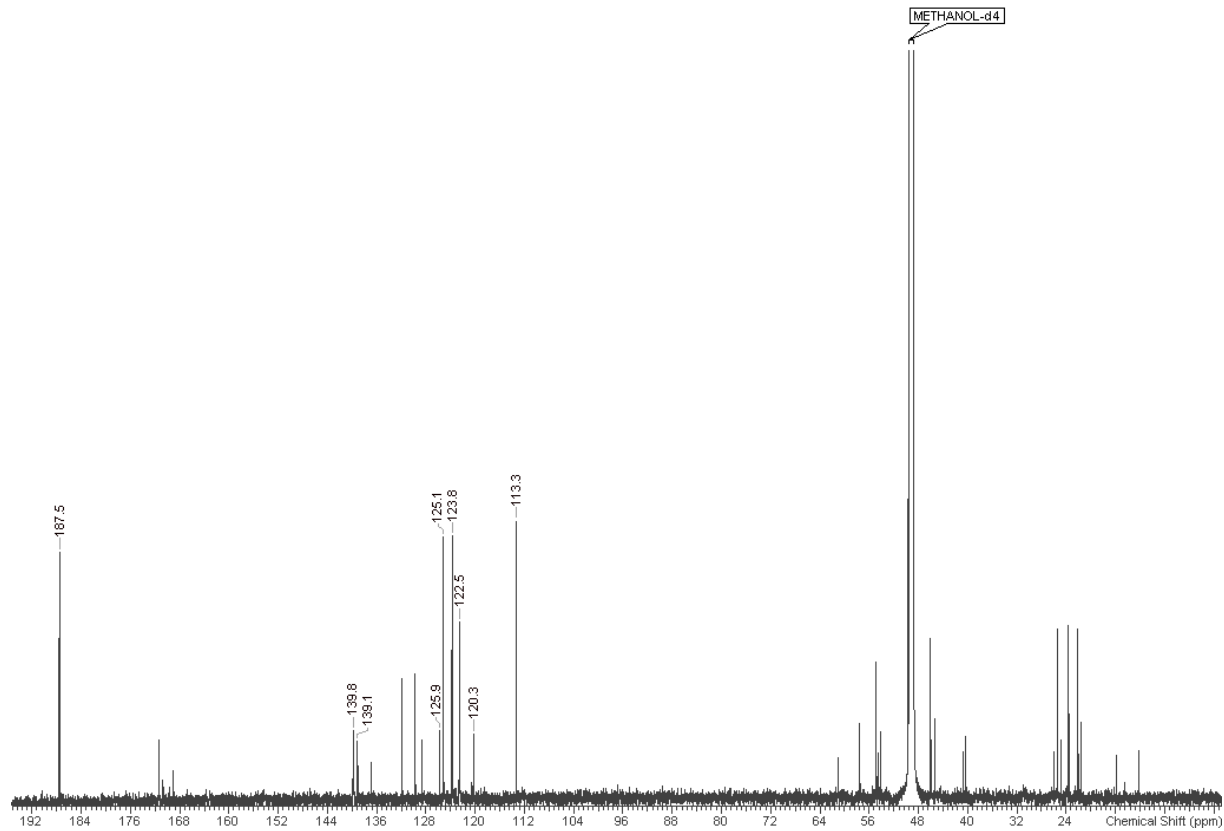
¹H-NMR-Spektrum Tryptophol **D13** (400 MHz, CD₃OD).



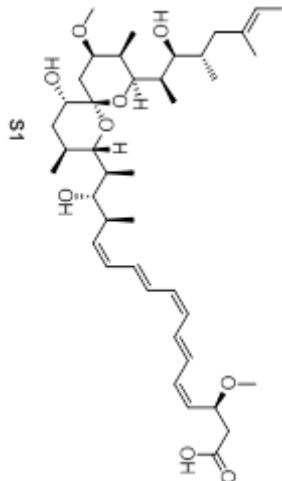
¹³C-NMR-Spektrum Tryptophol **D13** (75 MHz, CD₃OD).



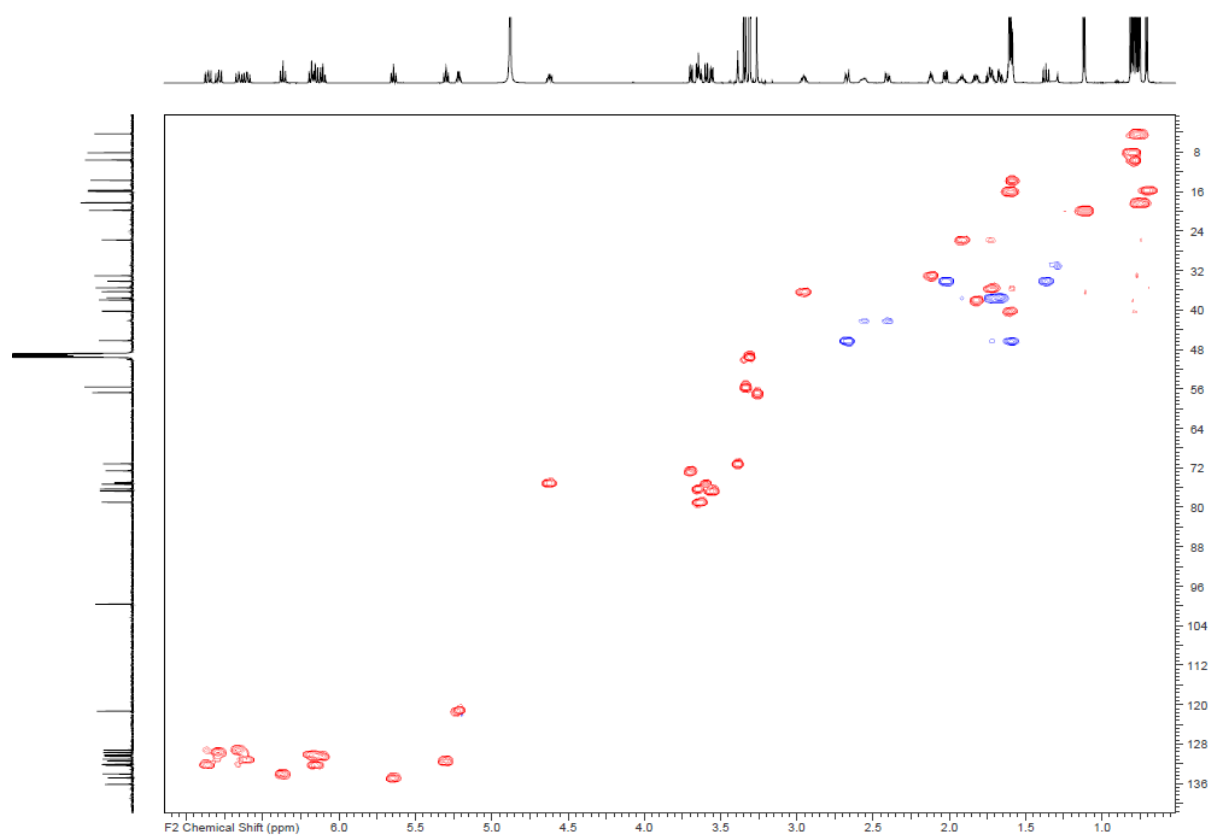
¹H-NMR-Spektrum 1H-Indol-3-carbaldehyd **D14** (400 MHz, CD₃OD).



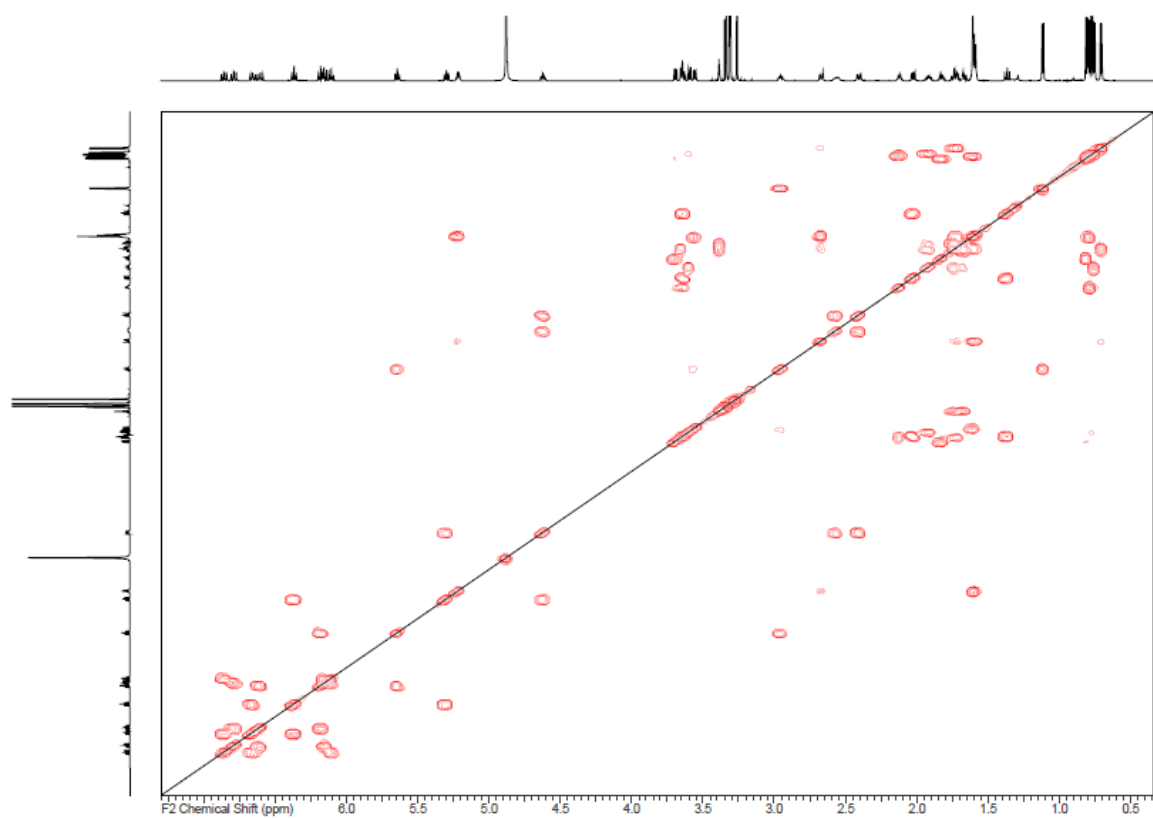
¹³C-NMR-Spektrum 1H-Indol-3-carbaldehyd **D14** (75 MHz, CD₃OD).



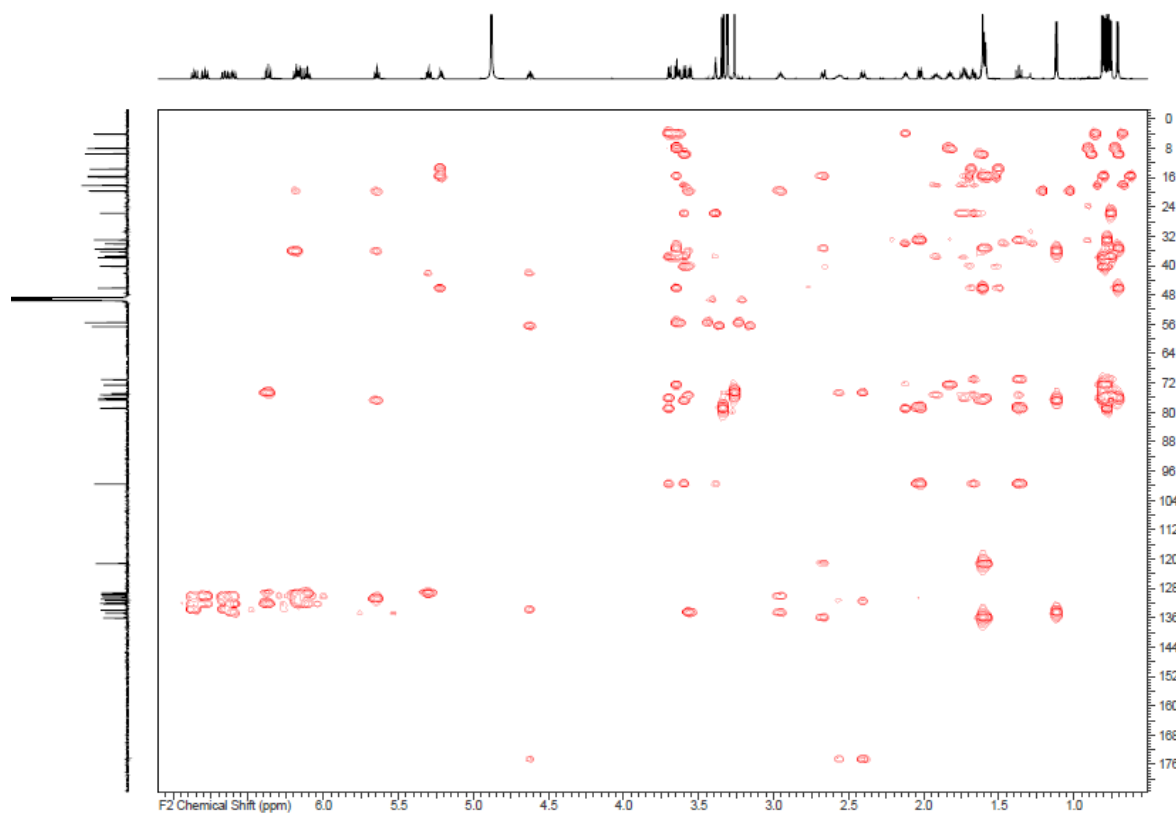




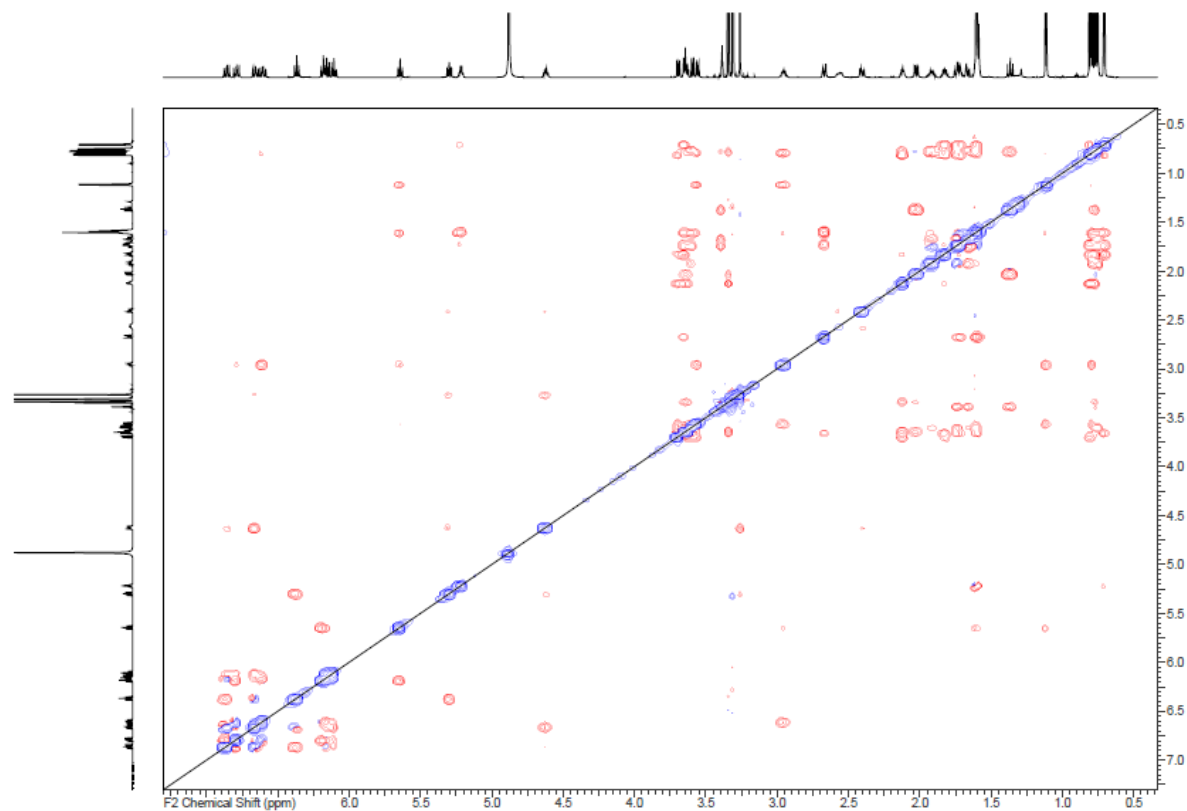
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien A **S1** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



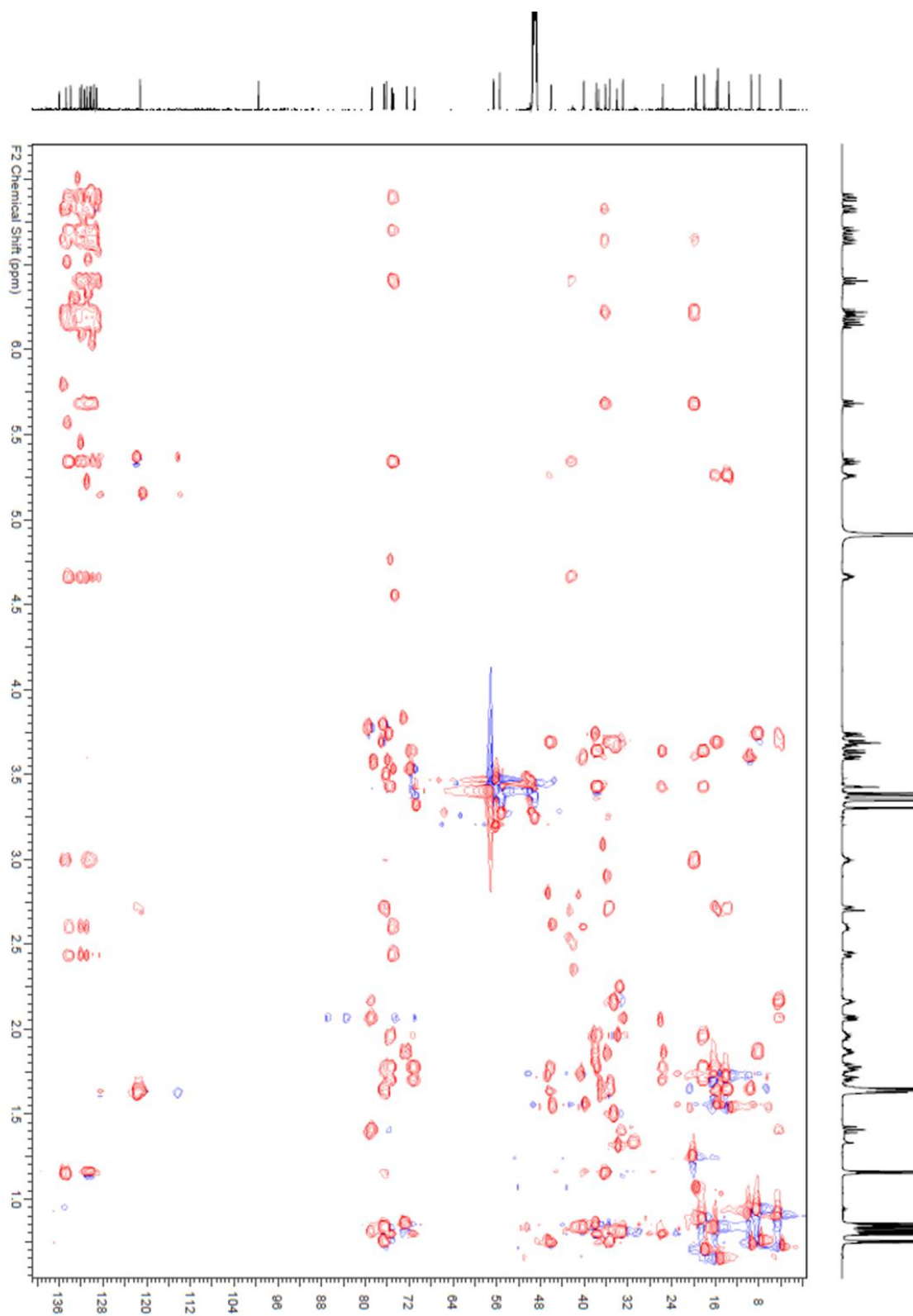
^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien A **S1** (^1H : 700 MHz).



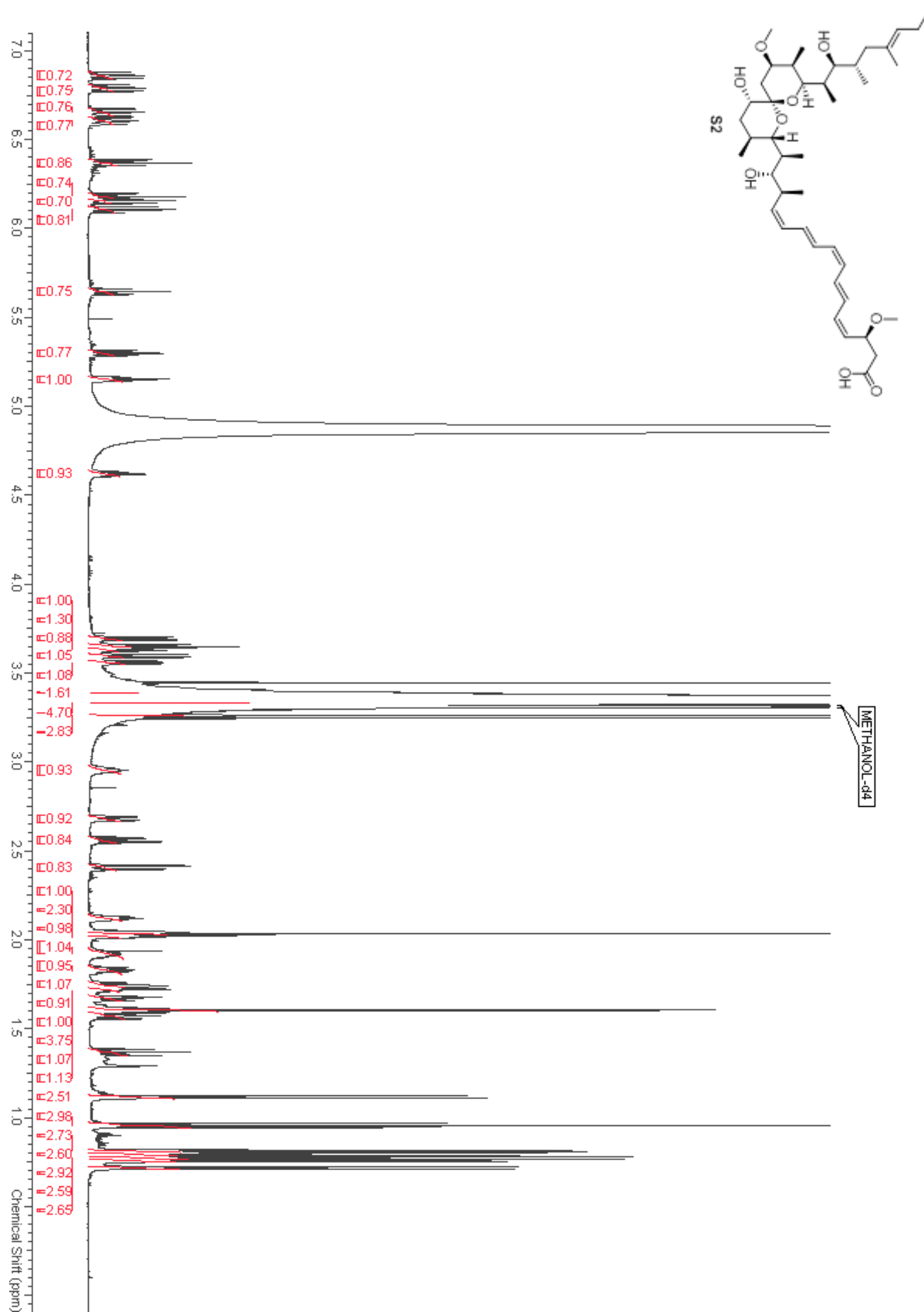
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien A **S1** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

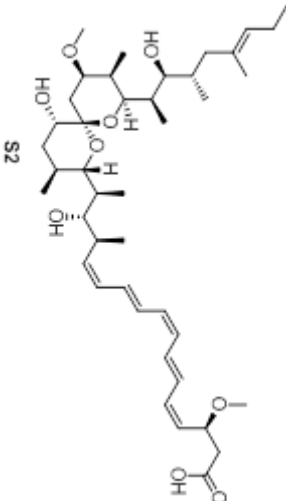


$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien A **S1** (^1H : 700 MHz).

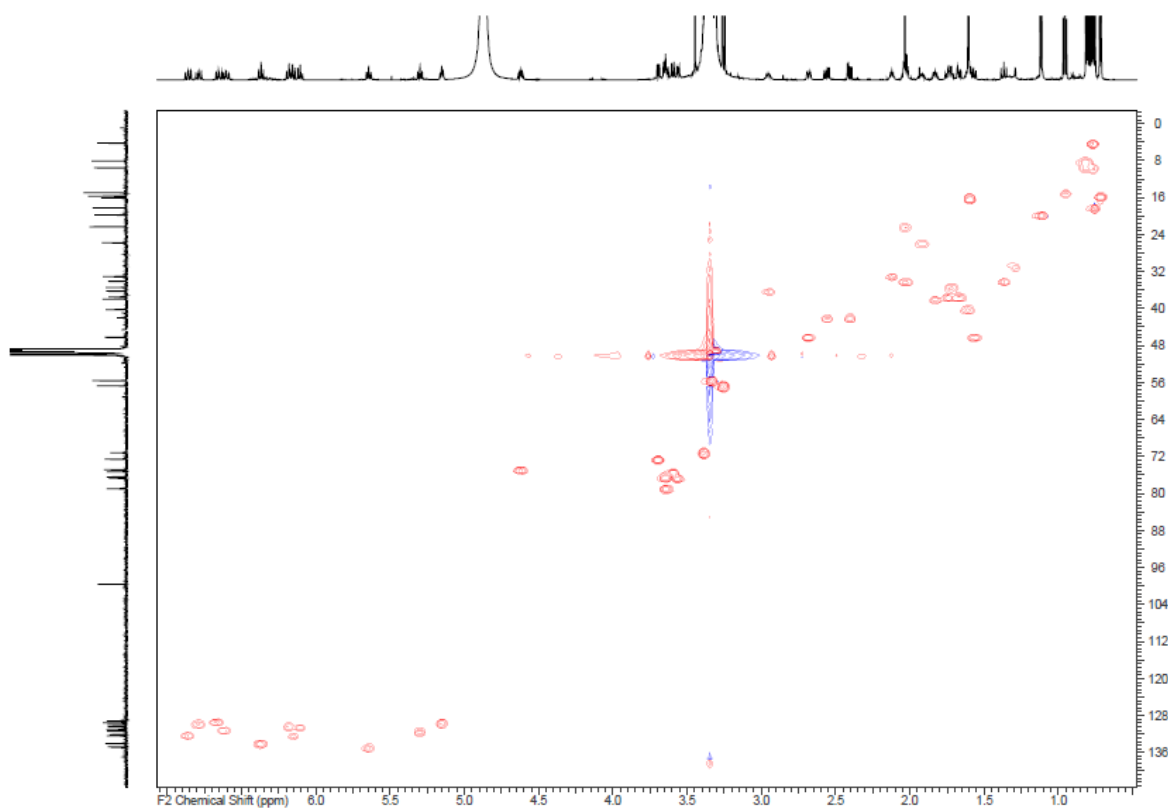


^1H , ^{13}C -HSQC-HECADE-NMR-Spektrum Spirangien A S1 (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

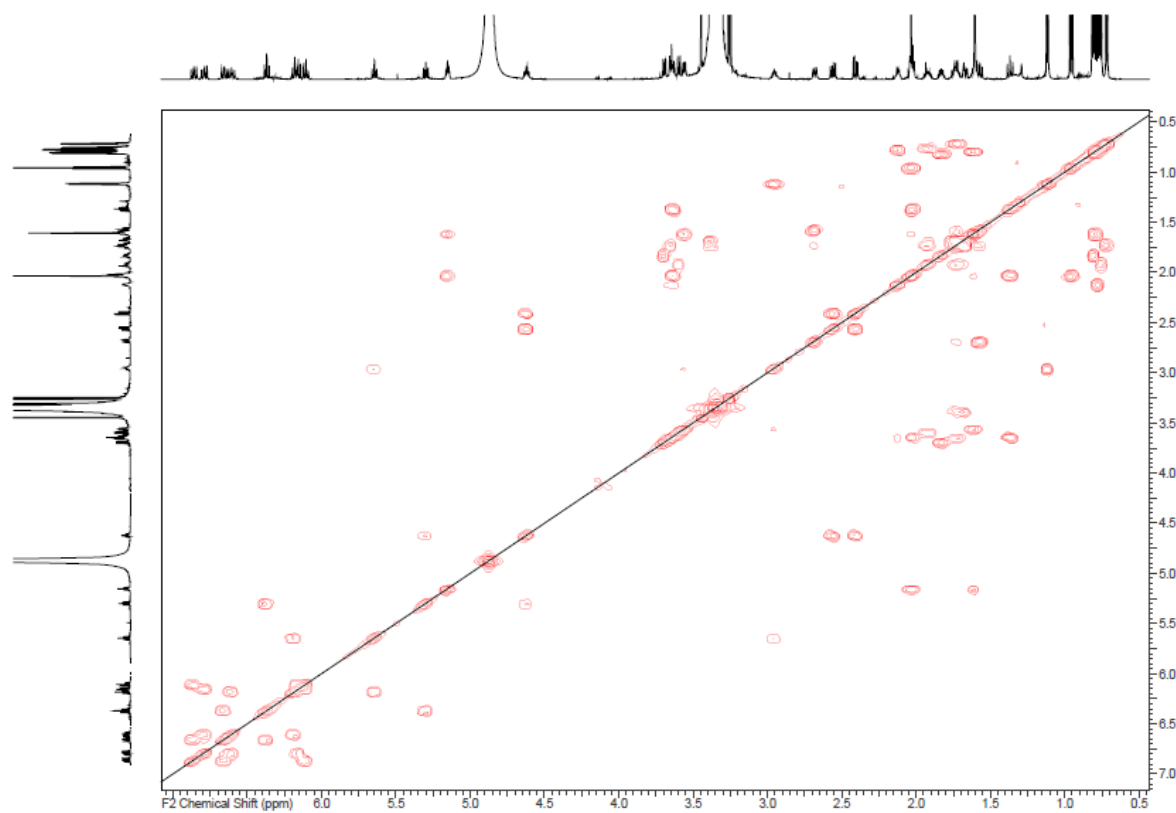
 ^1H -NMR-Spektrum Spirangien B S2 (700 MHz, CD_3OD).



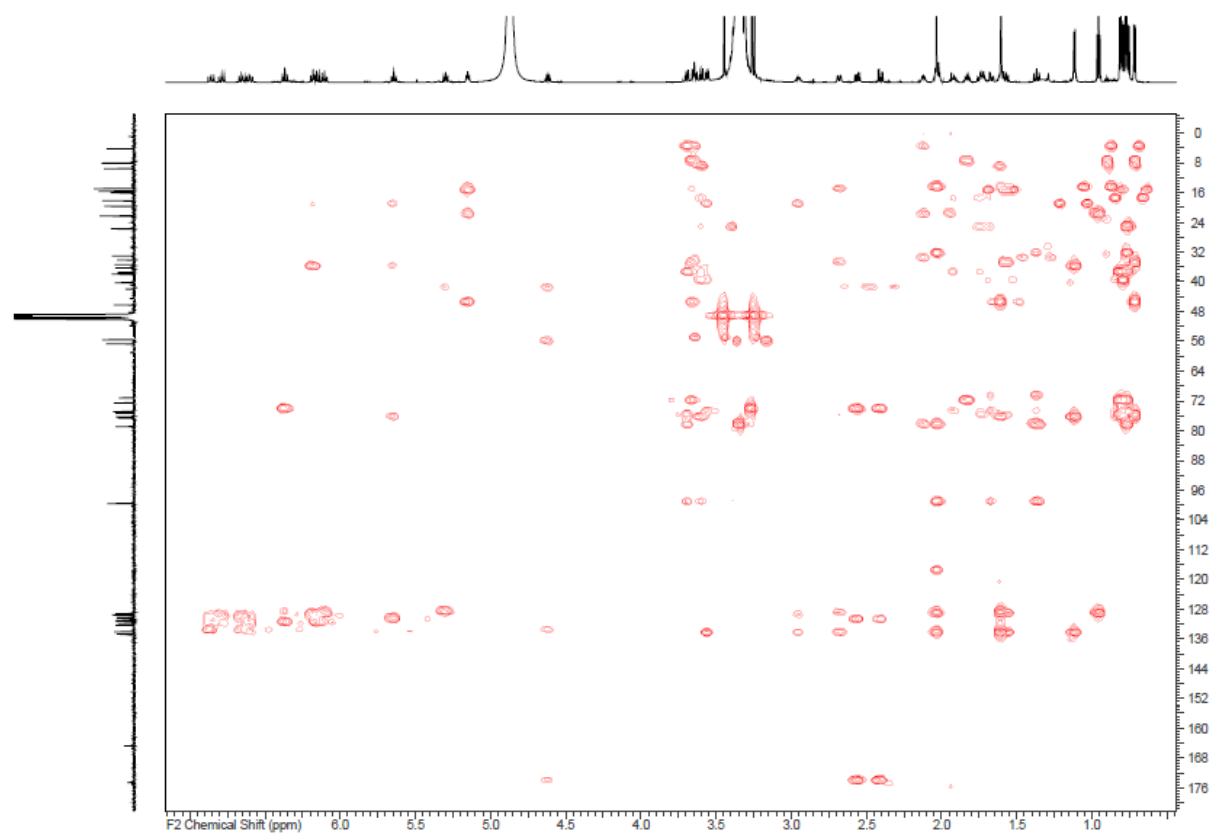
216



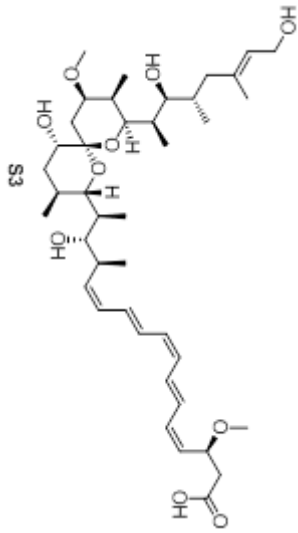
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien B **S2** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

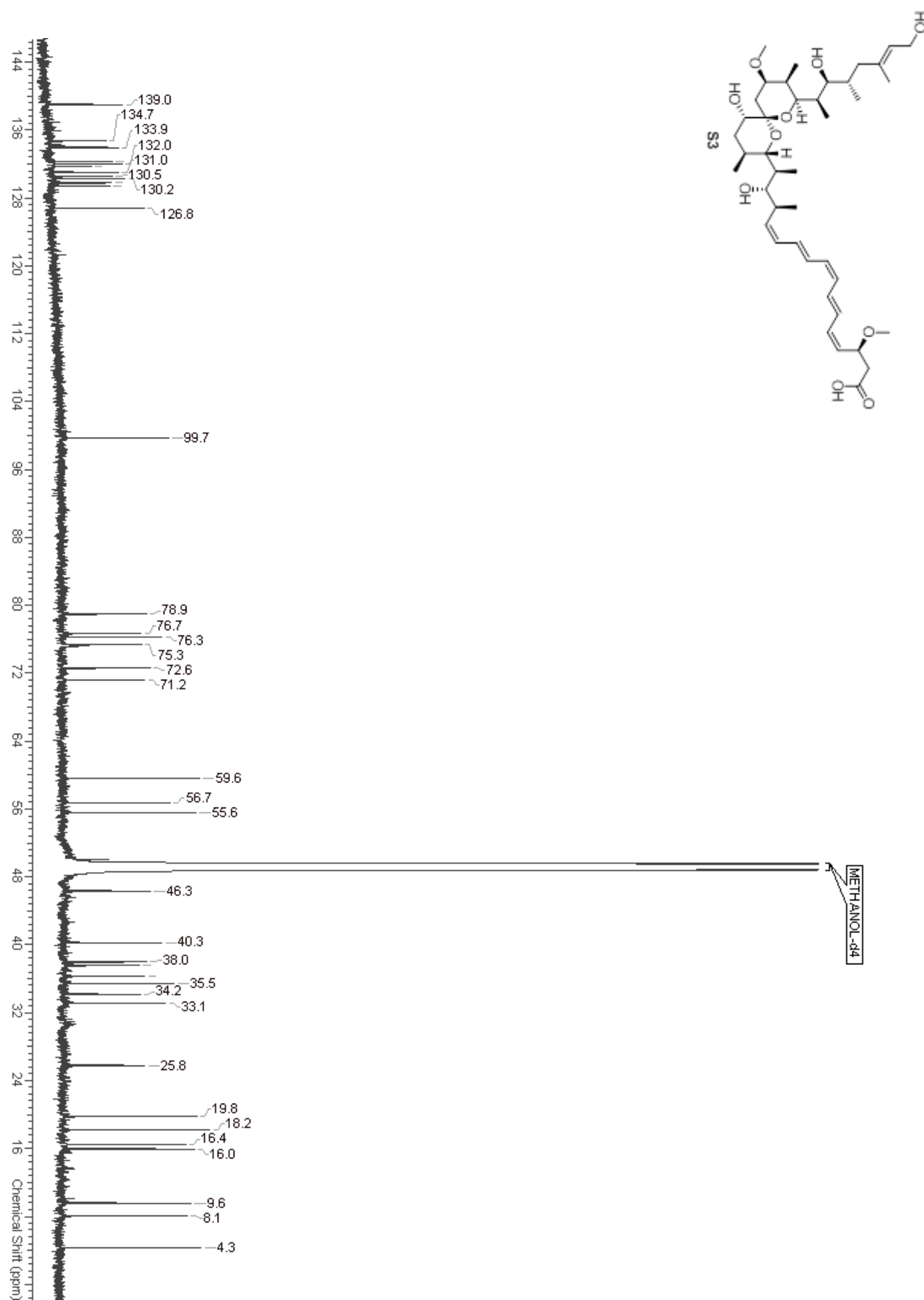


^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien B **S2** (^1H : 700 MHz).

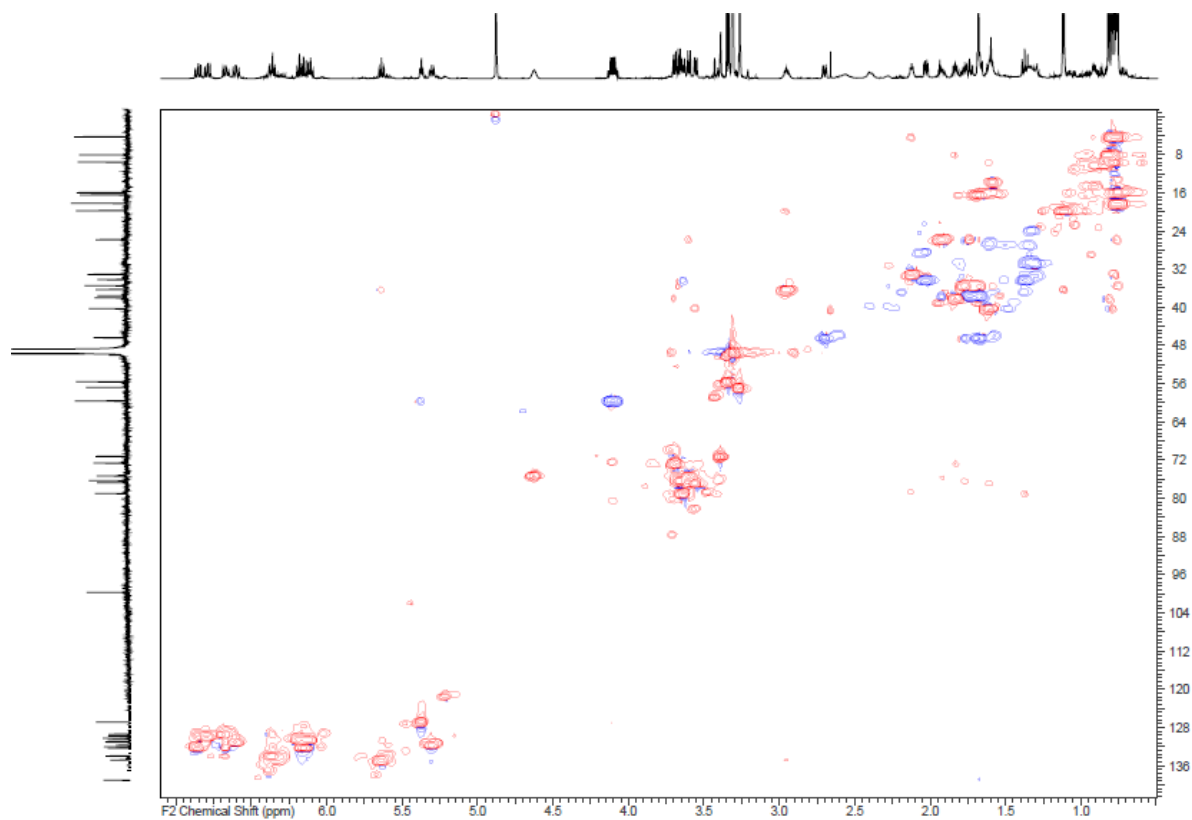


^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien B **S2** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

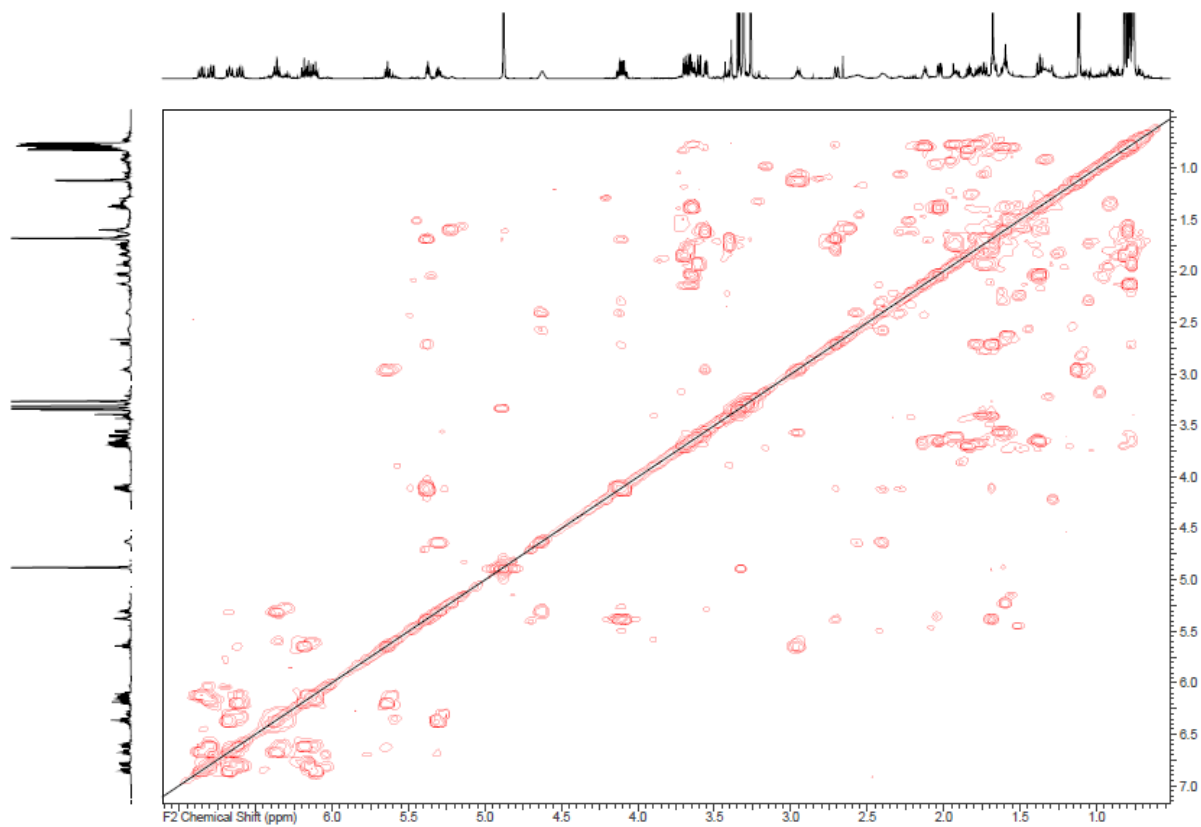




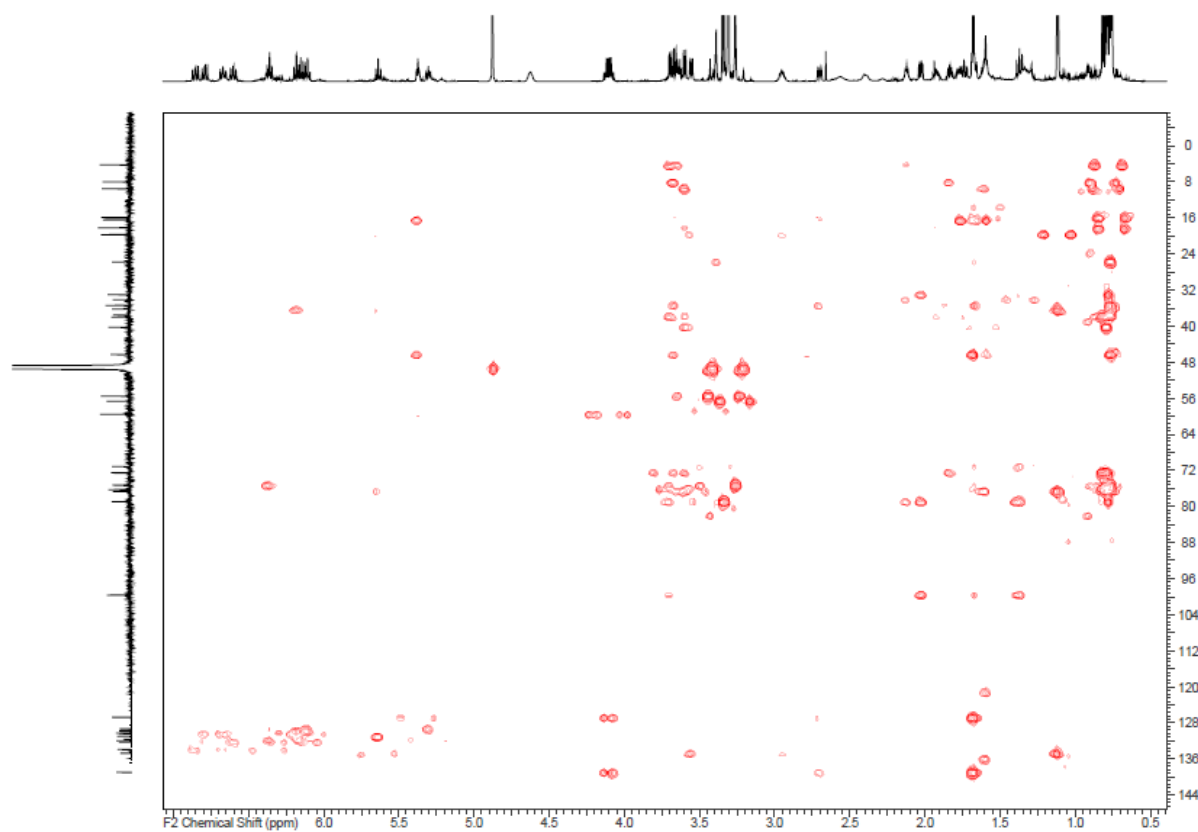
^{13}C -NMR-Spektrum Spirangien G **S3** (176 MHz, CD_3OD).



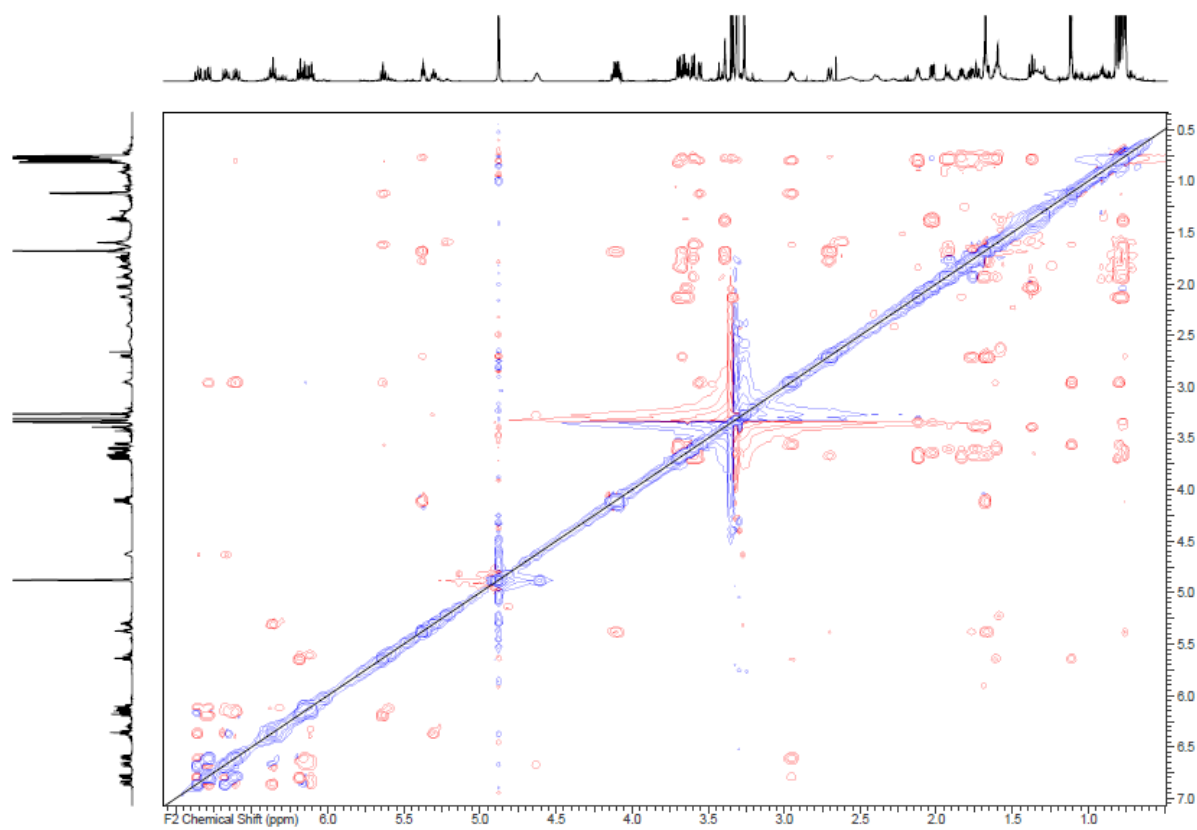
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien G **S3** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



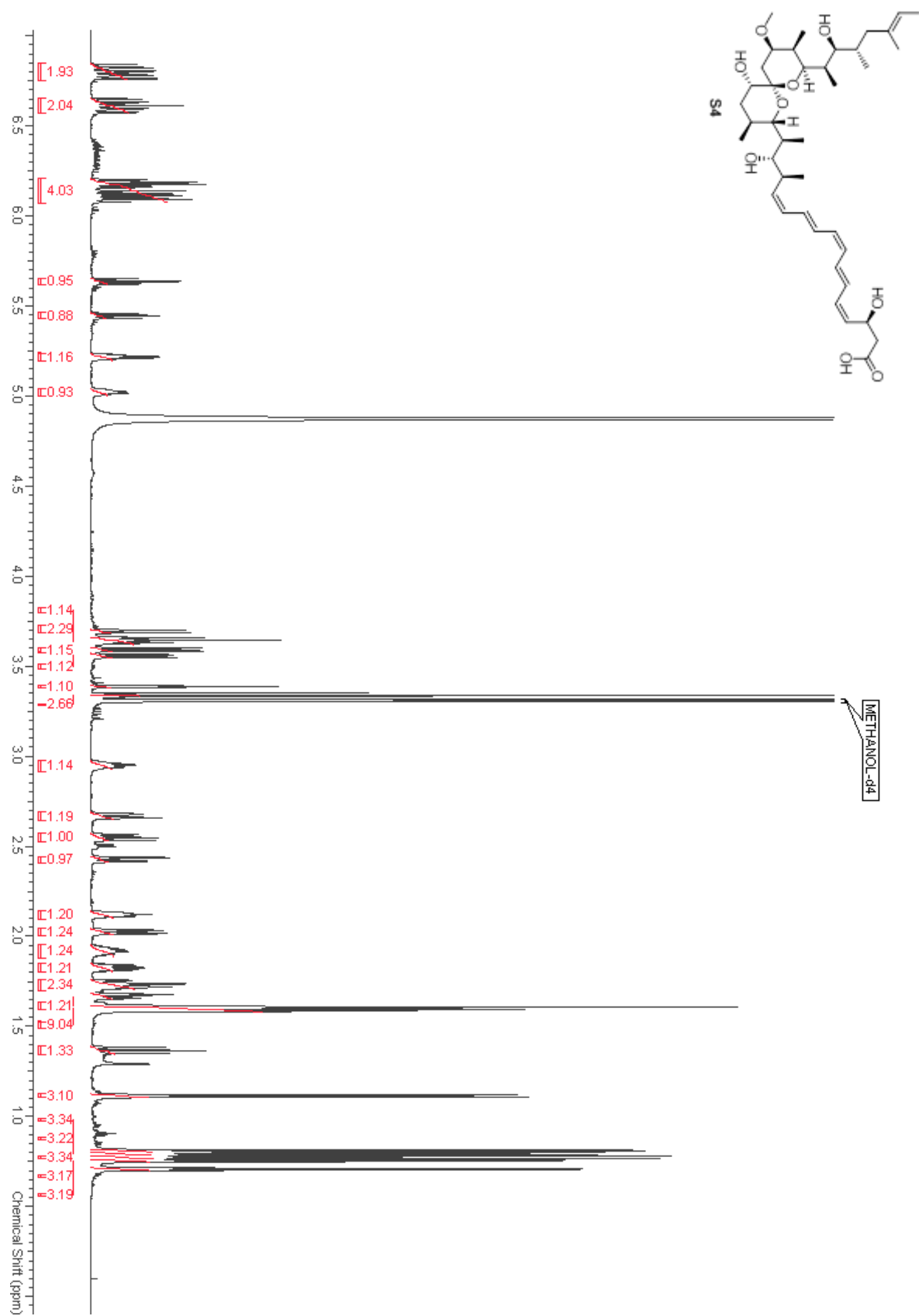
^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien G **S3** (^1H : 700 MHz).



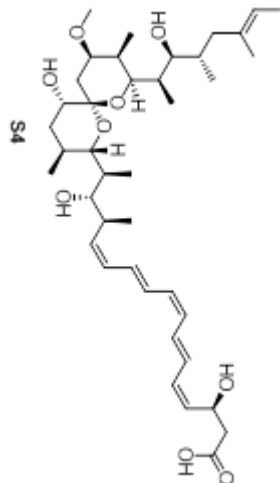
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien G **S3** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



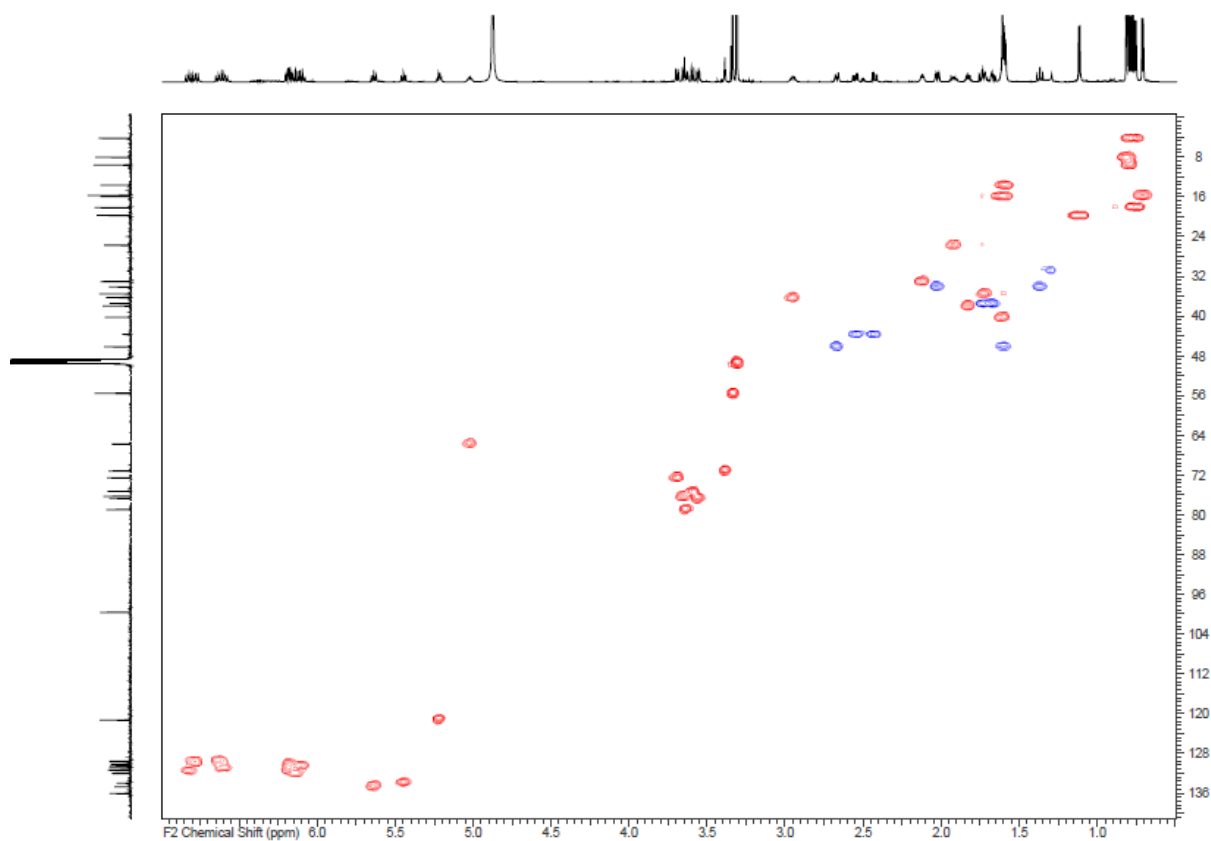
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien G **S3** (^1H : 700 MHz).



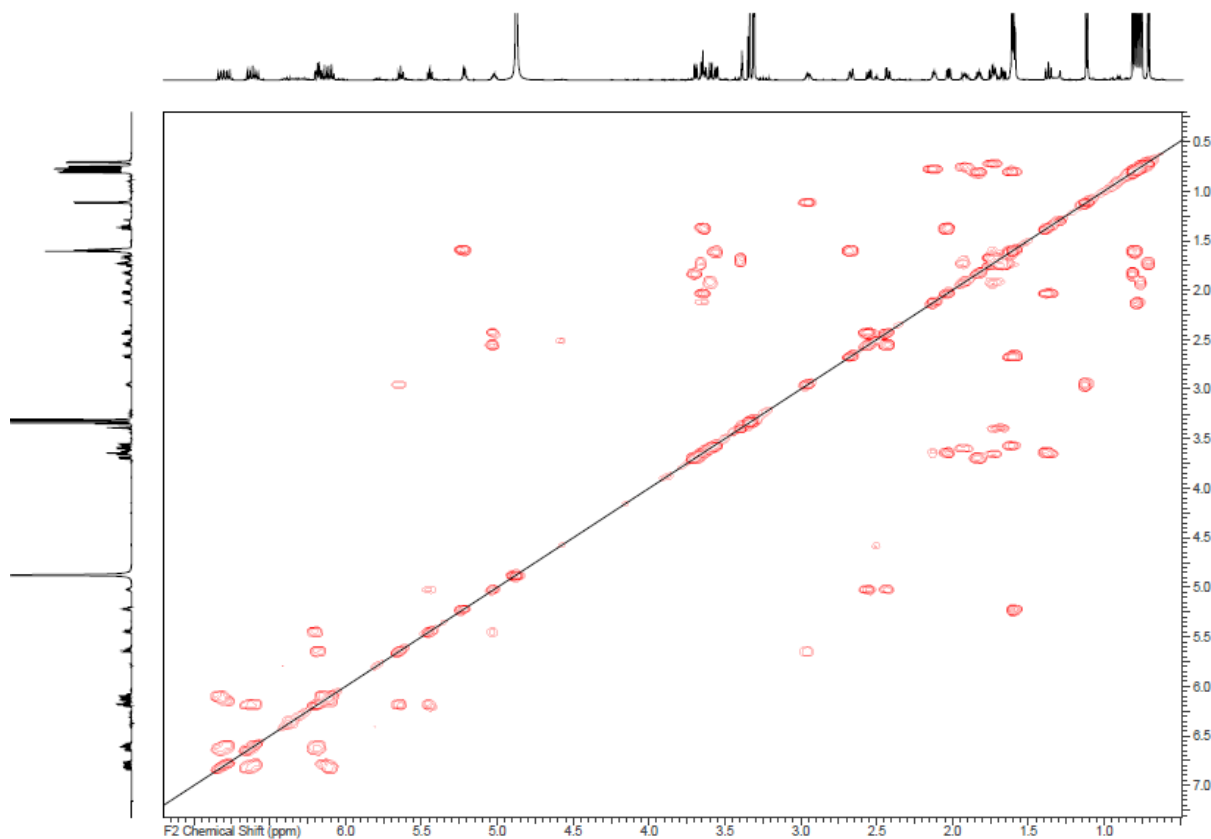
¹H-NMR-Spektrum Spirangien H **S4** (700 MHz, CD₃OD).



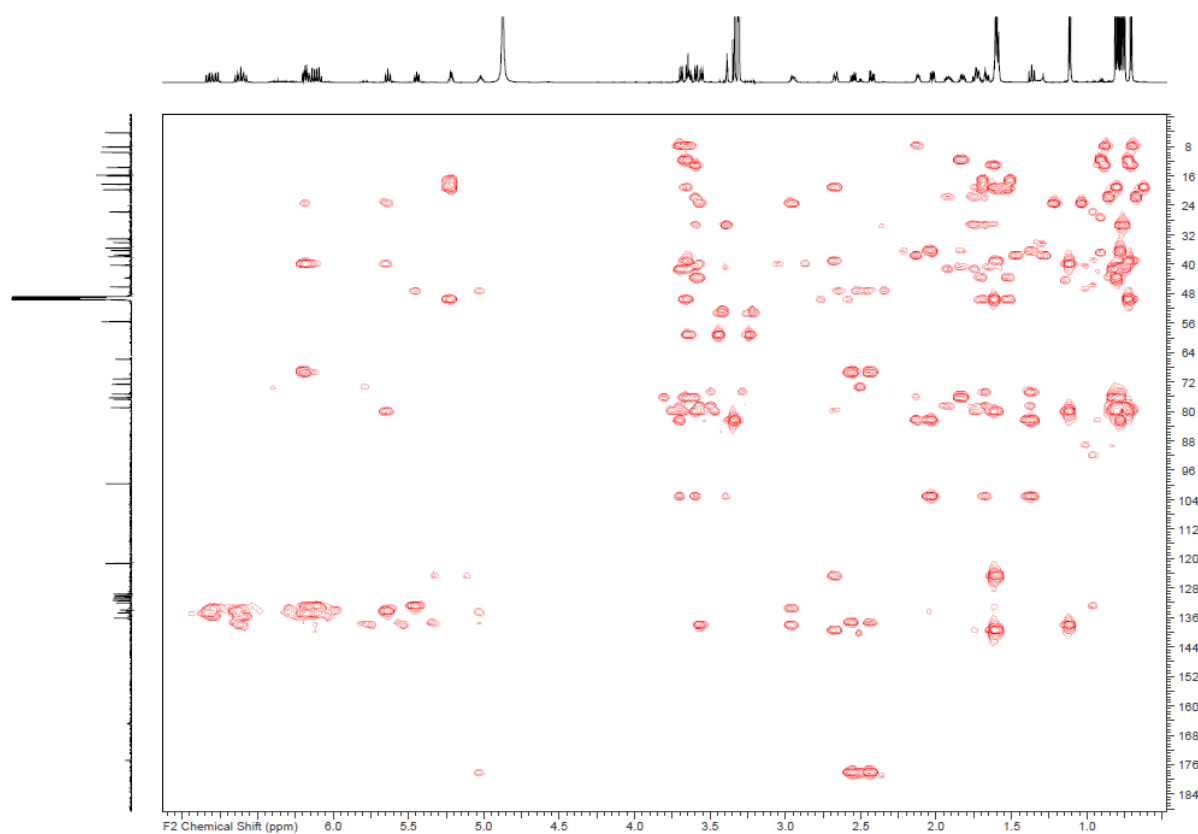
224



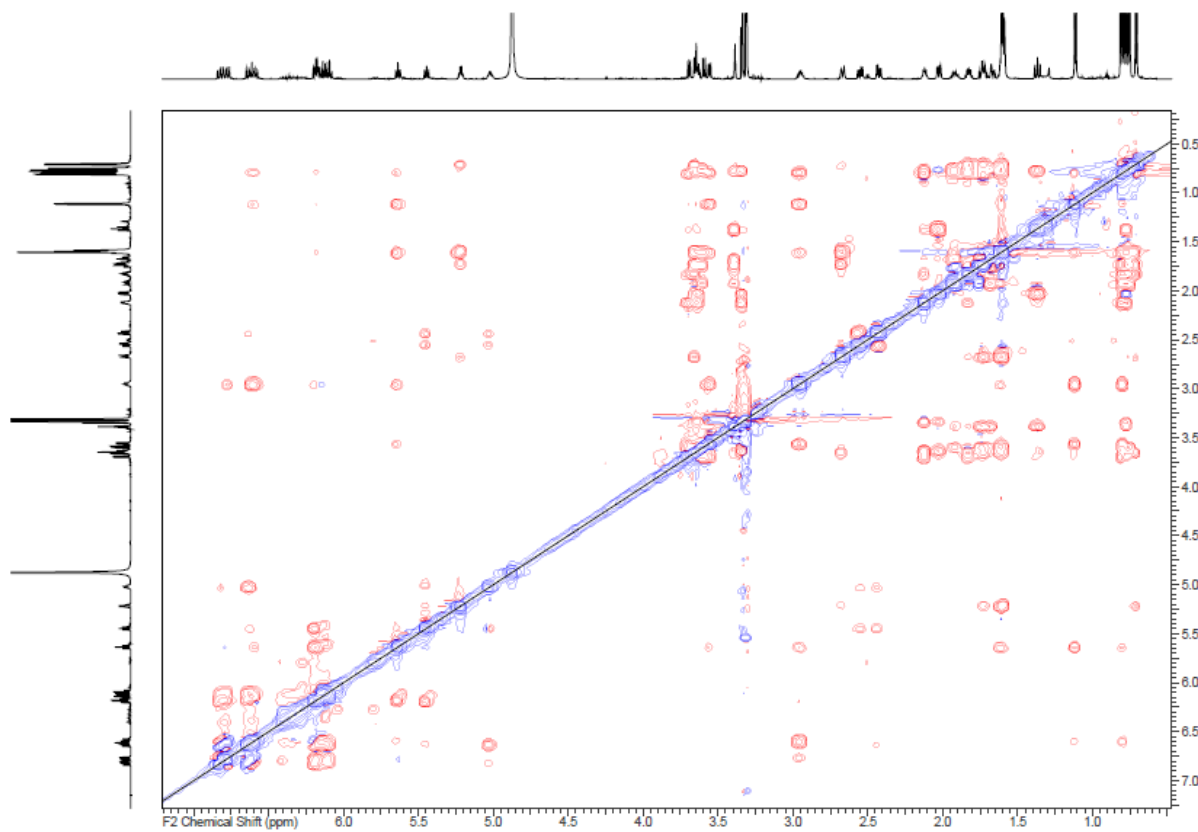
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien H **S4** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien H **S4** (^1H : 700 MHz).

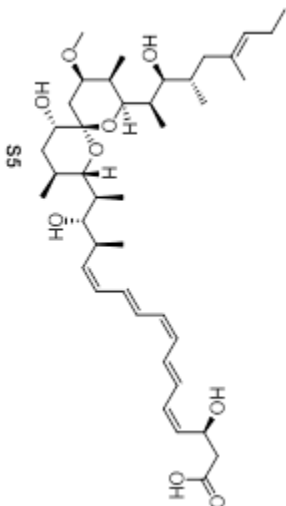


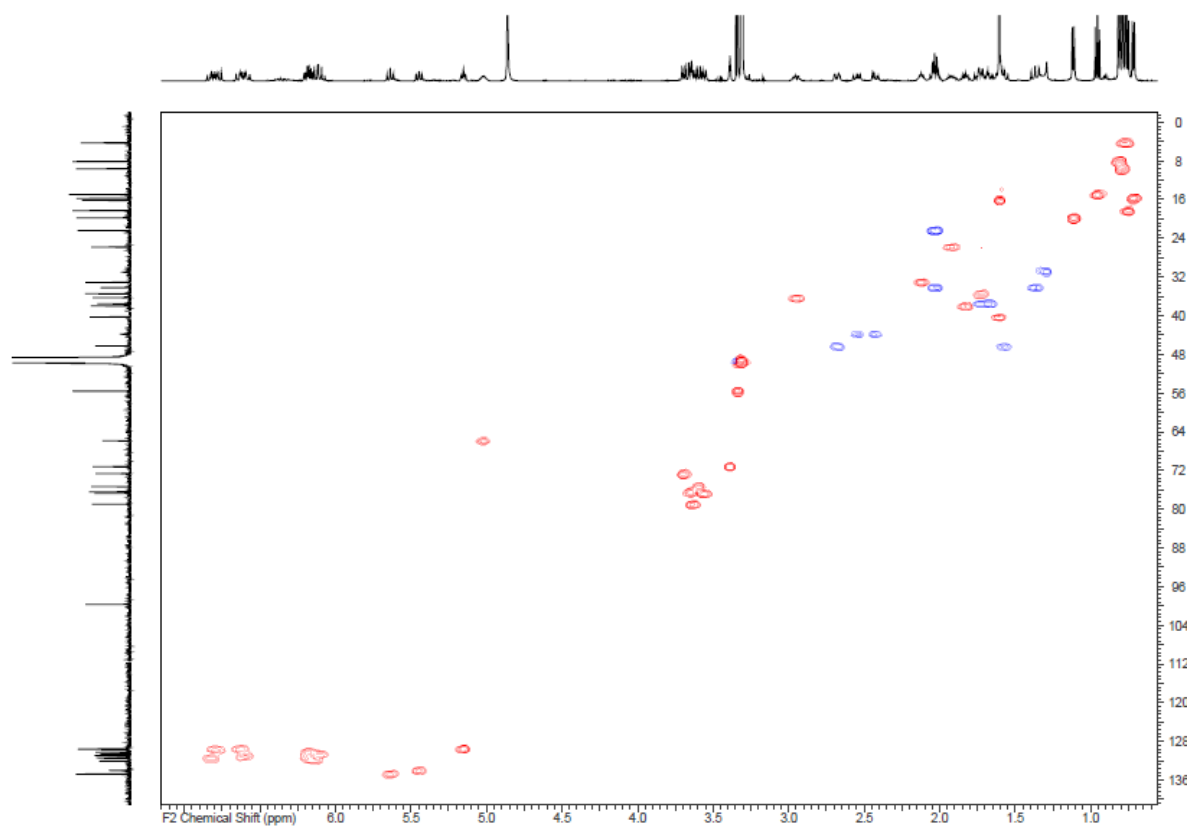
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien H **S4** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



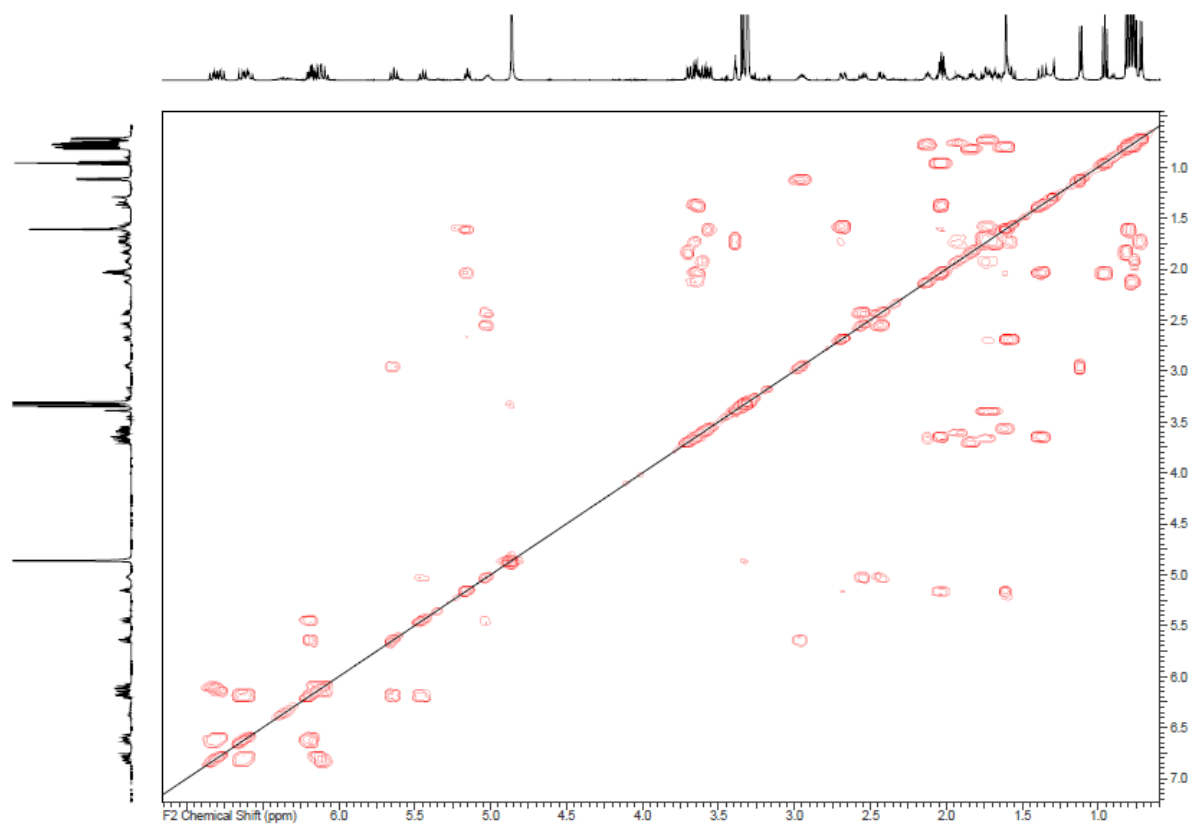
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien H **S4** (^1H : 700 MHz).



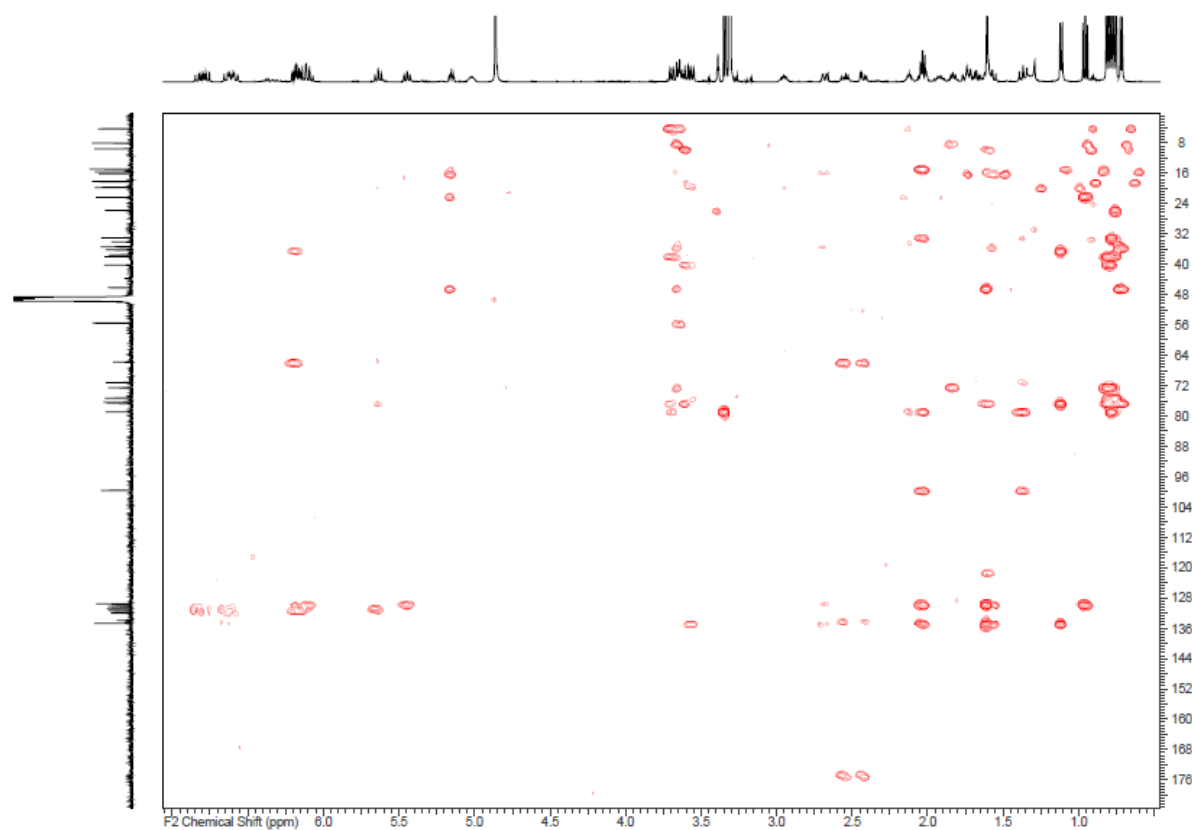




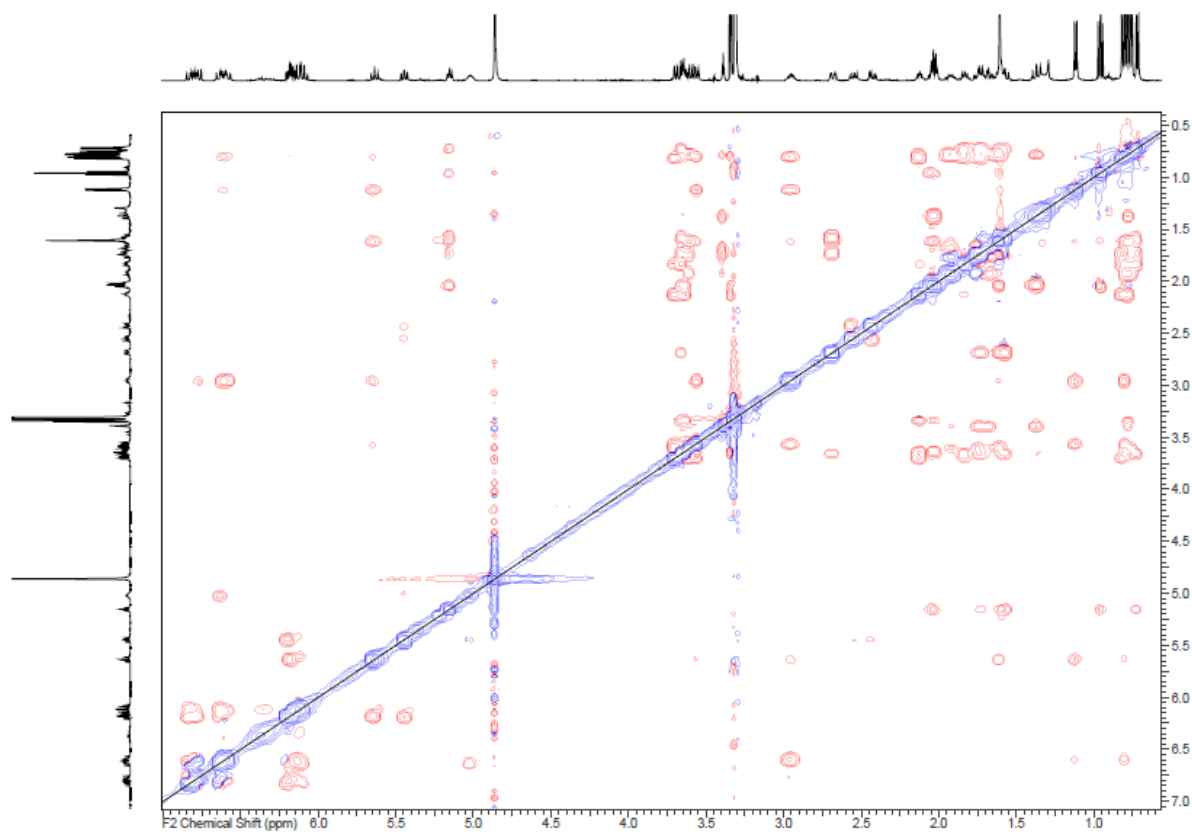
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien I **S5** (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz).



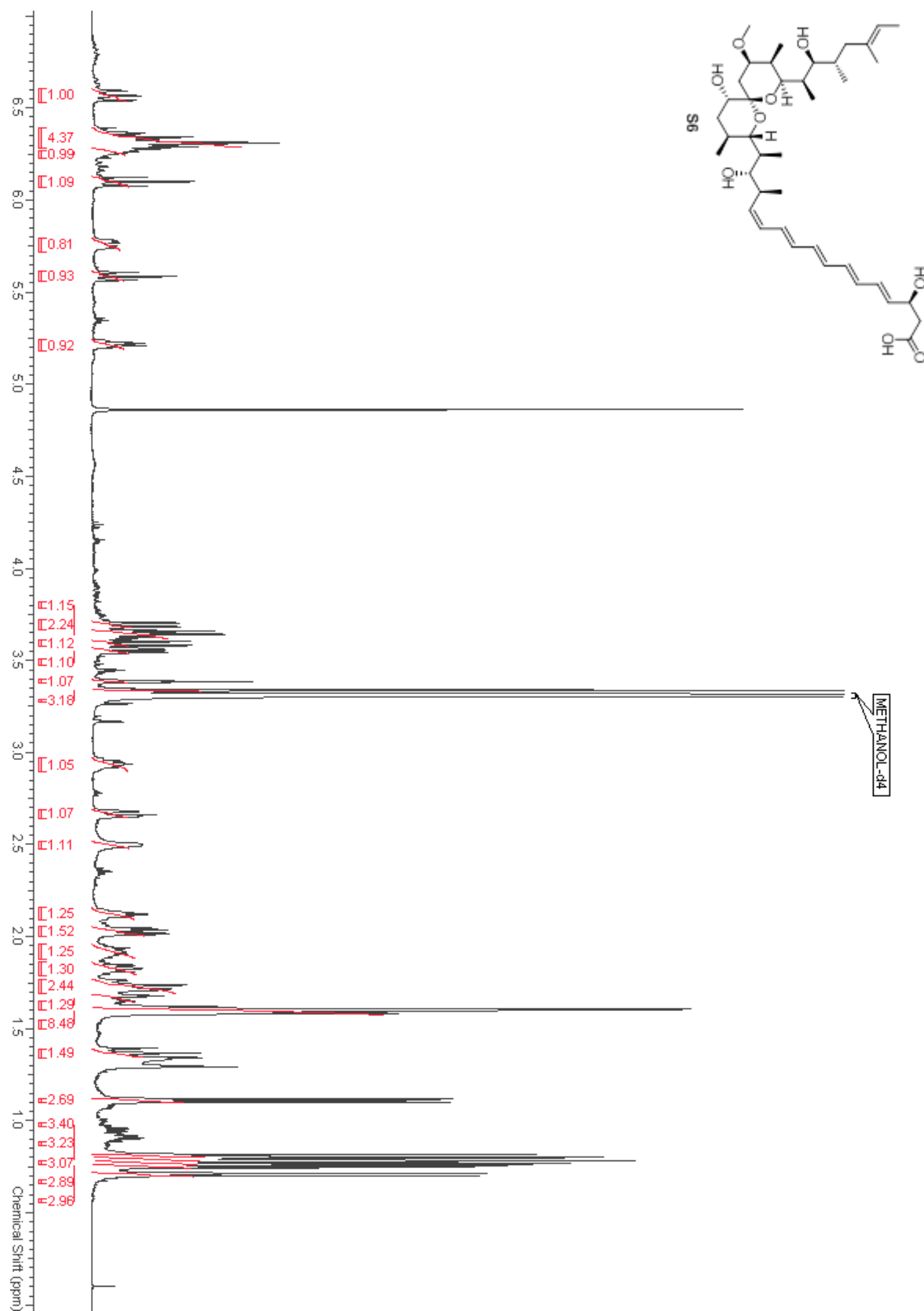
^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien I **S5** (^1H : 500 MHz).



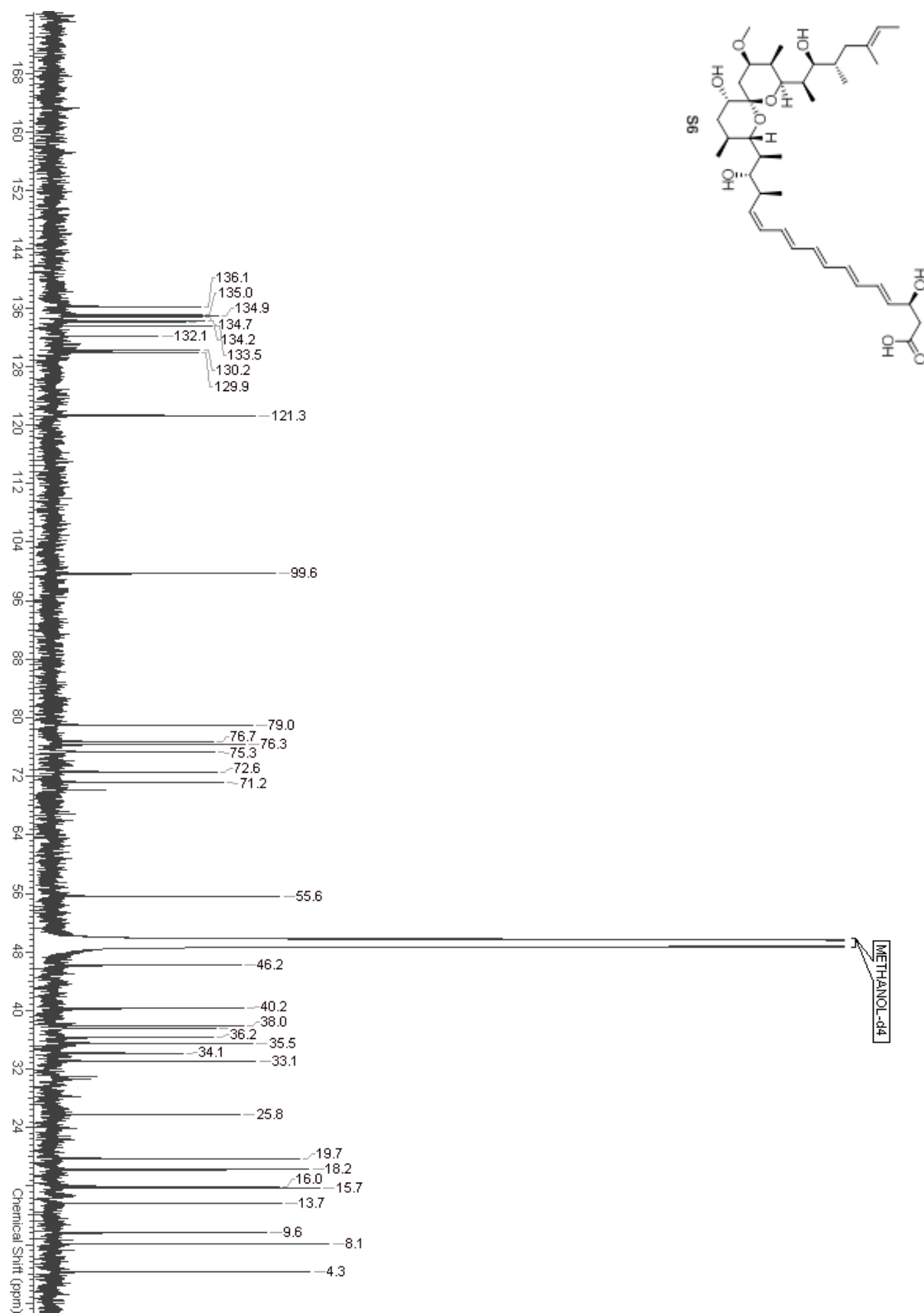
^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien I S5 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz).



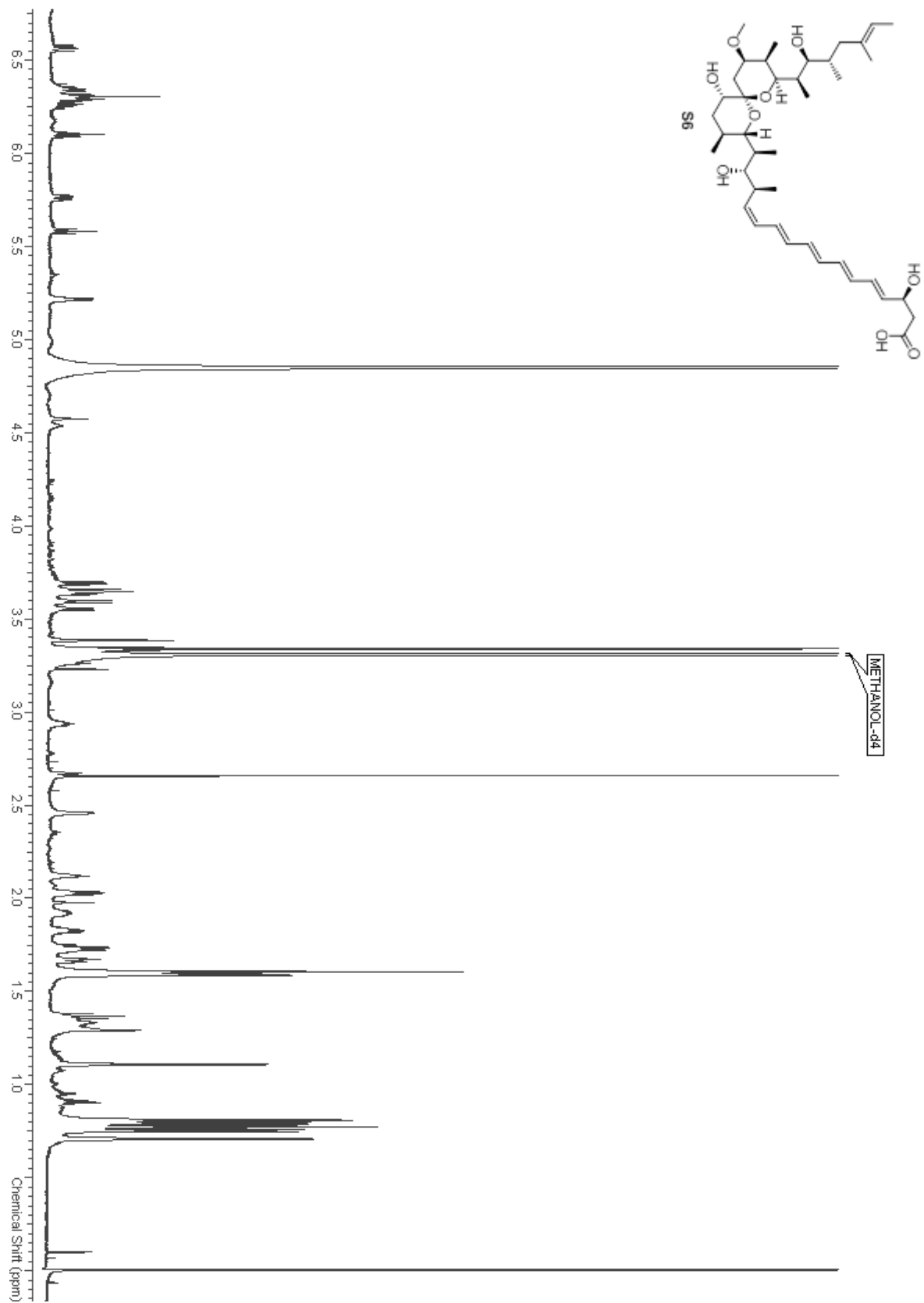
^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien I S5 (^1H : 500 MHz).



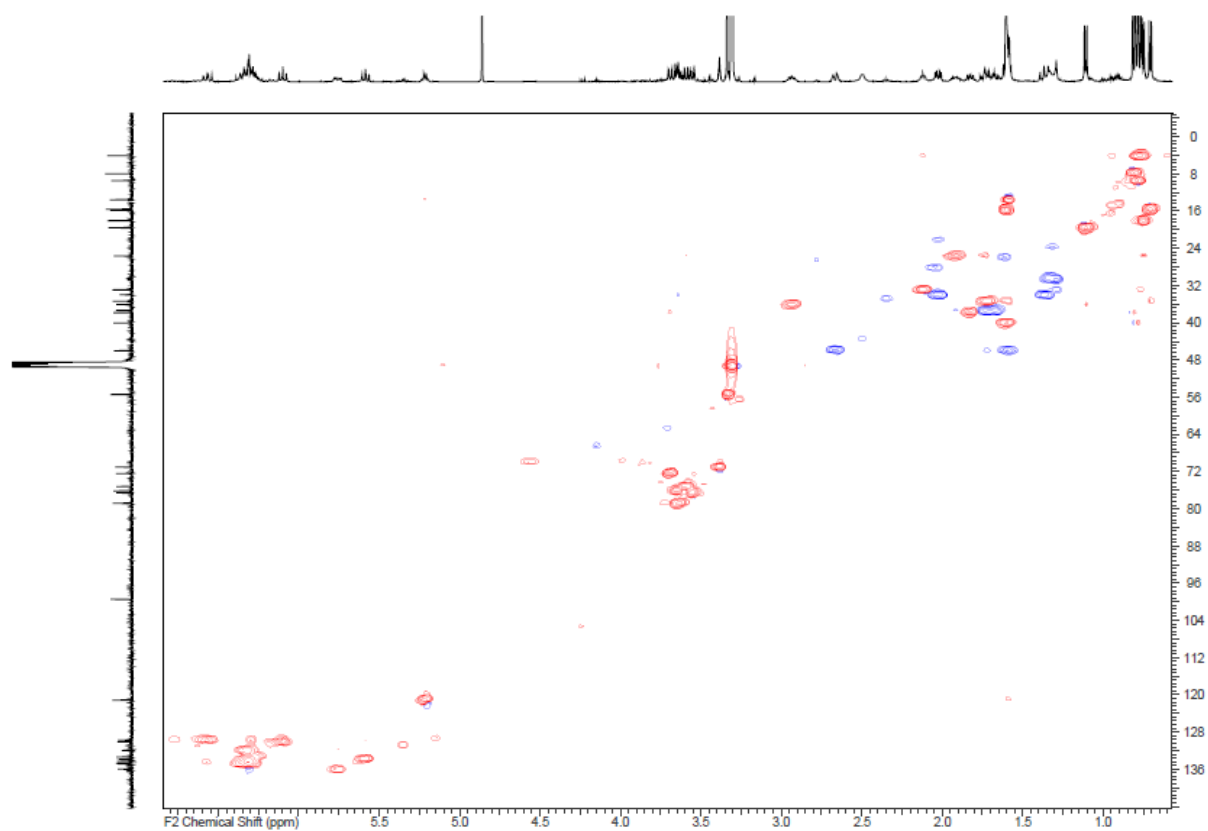
¹H-NMR-Spektrum Spirangien J S6 (700 MHz, CD₃OD).



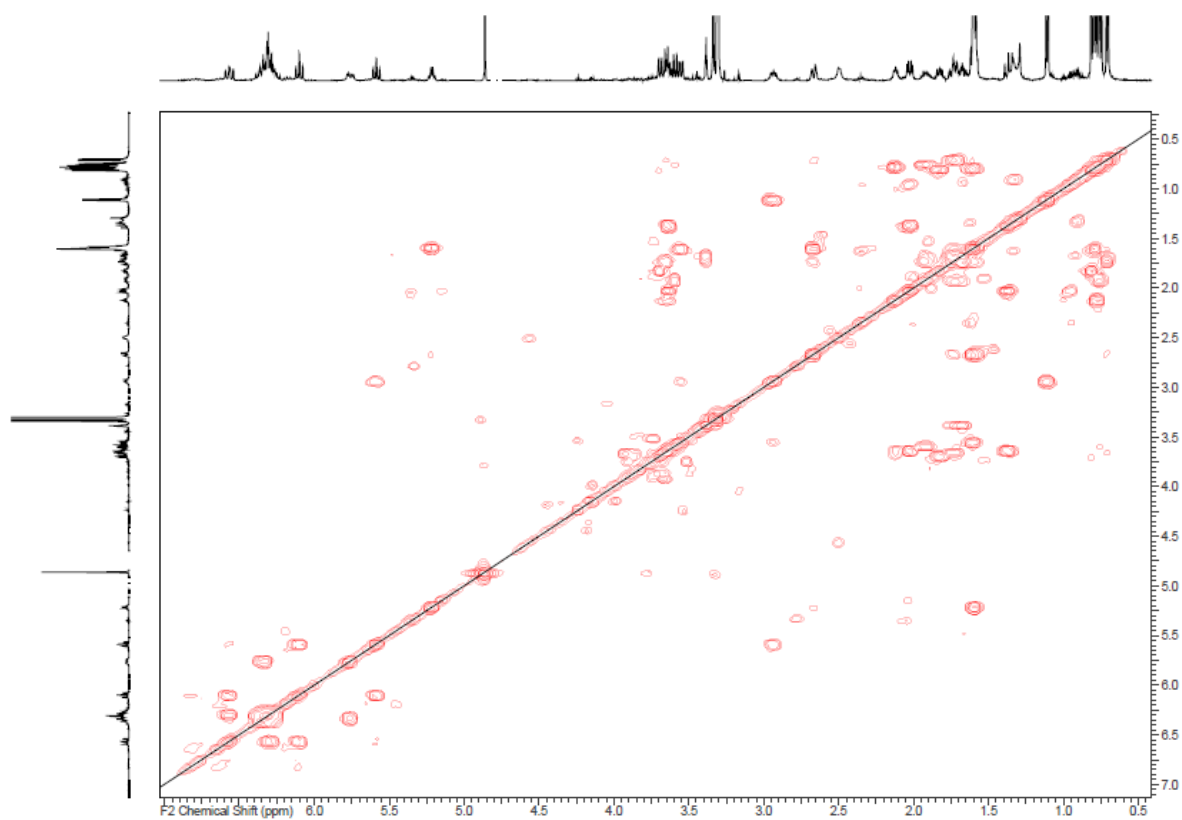
¹³C-NMR-Spektrum Spirangien J S6 (126 MHz, CD₃OD).



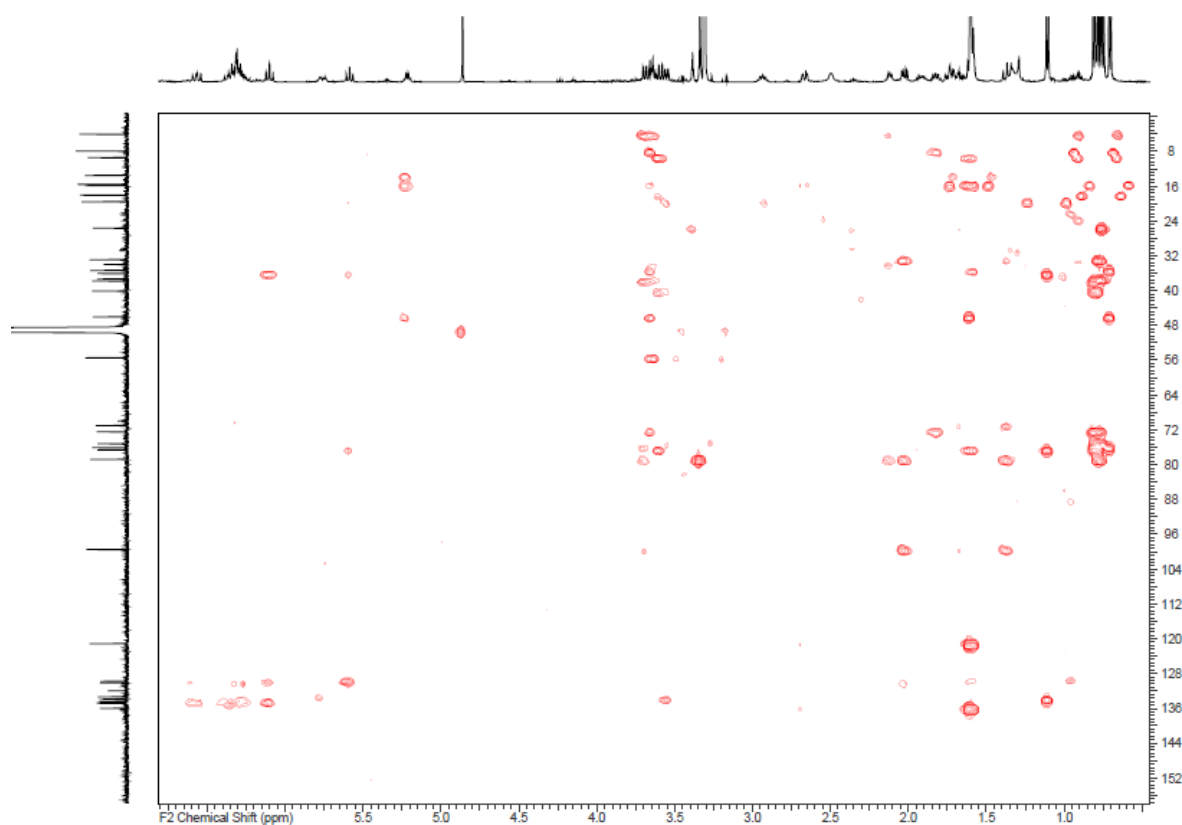
^1H -NMR-Spektrum Spirangien J **S6** (900 MHz, CD_3OD).



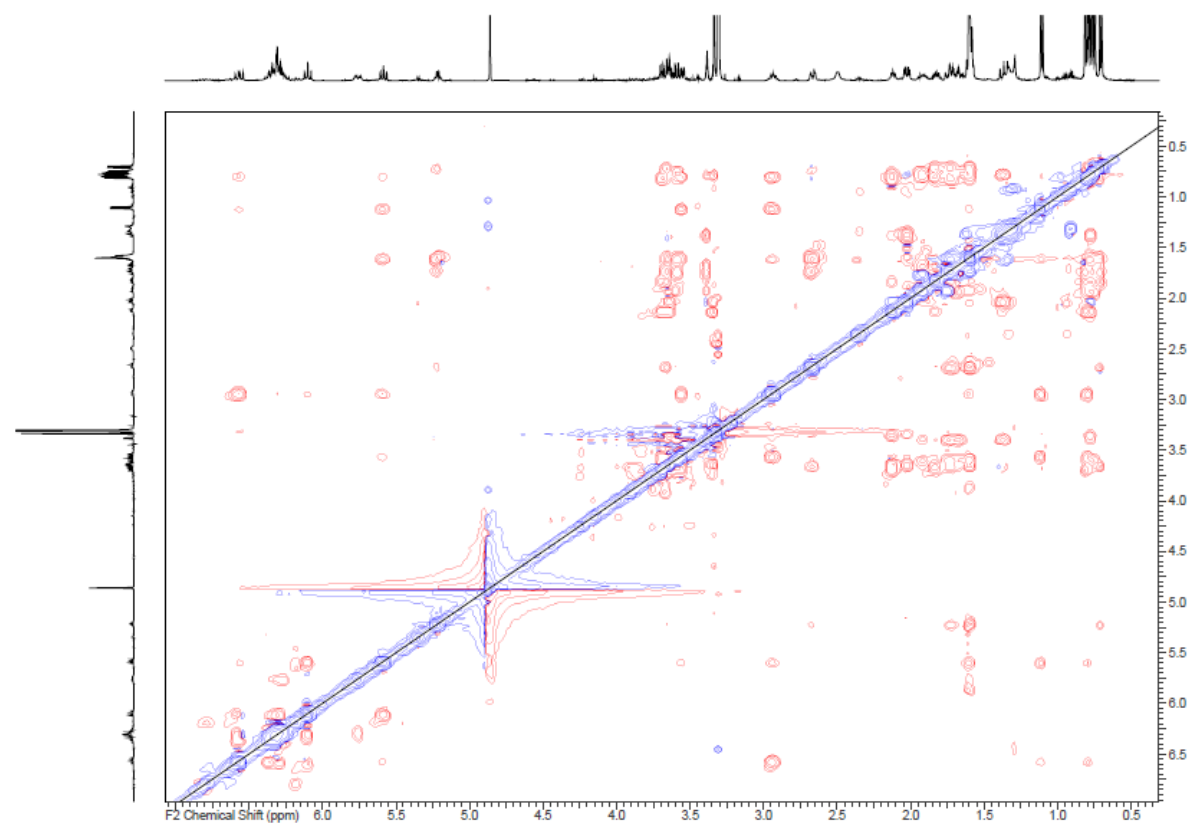
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien J S6 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz).



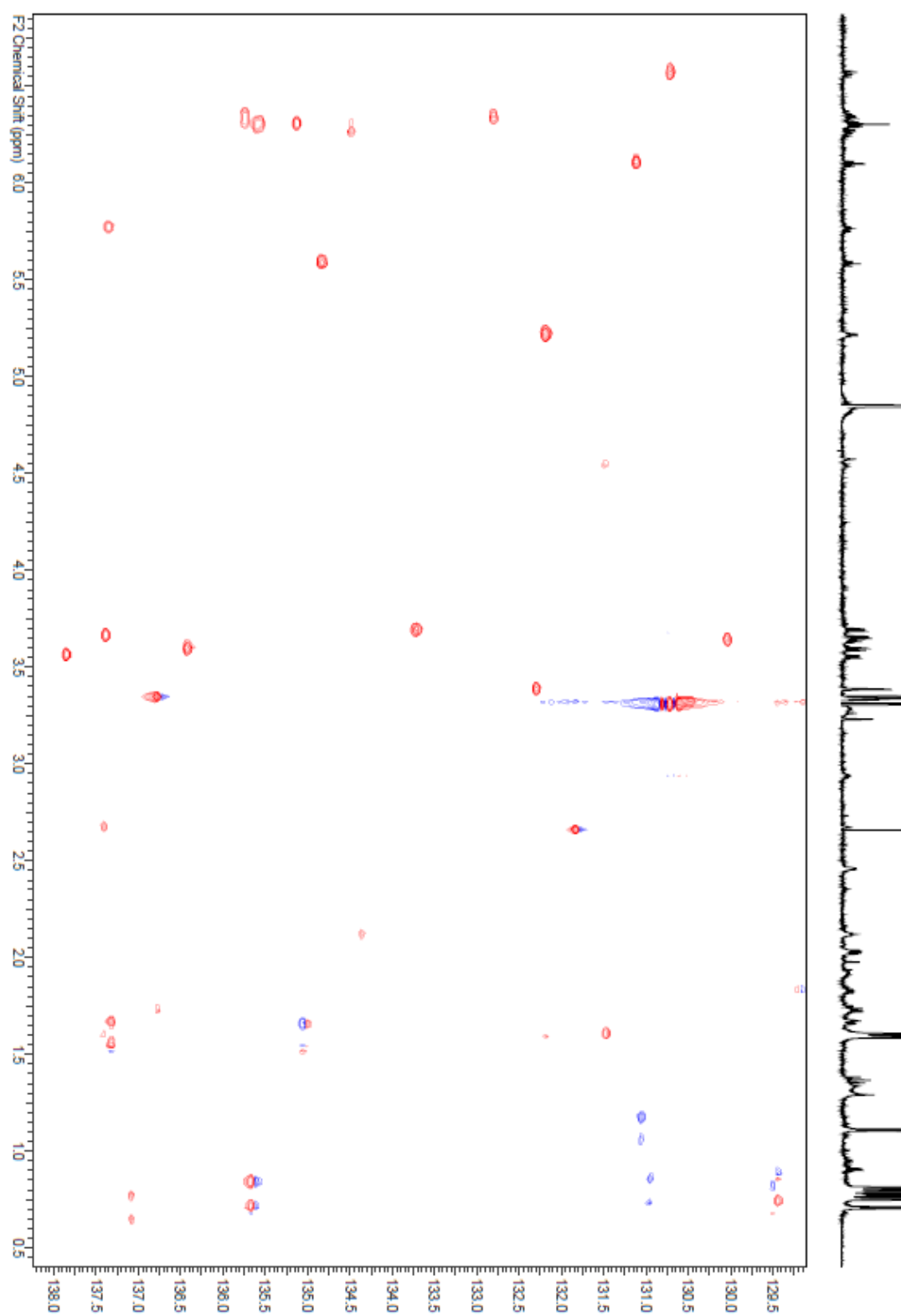
^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien J S6 (^1H : 700 MHz).



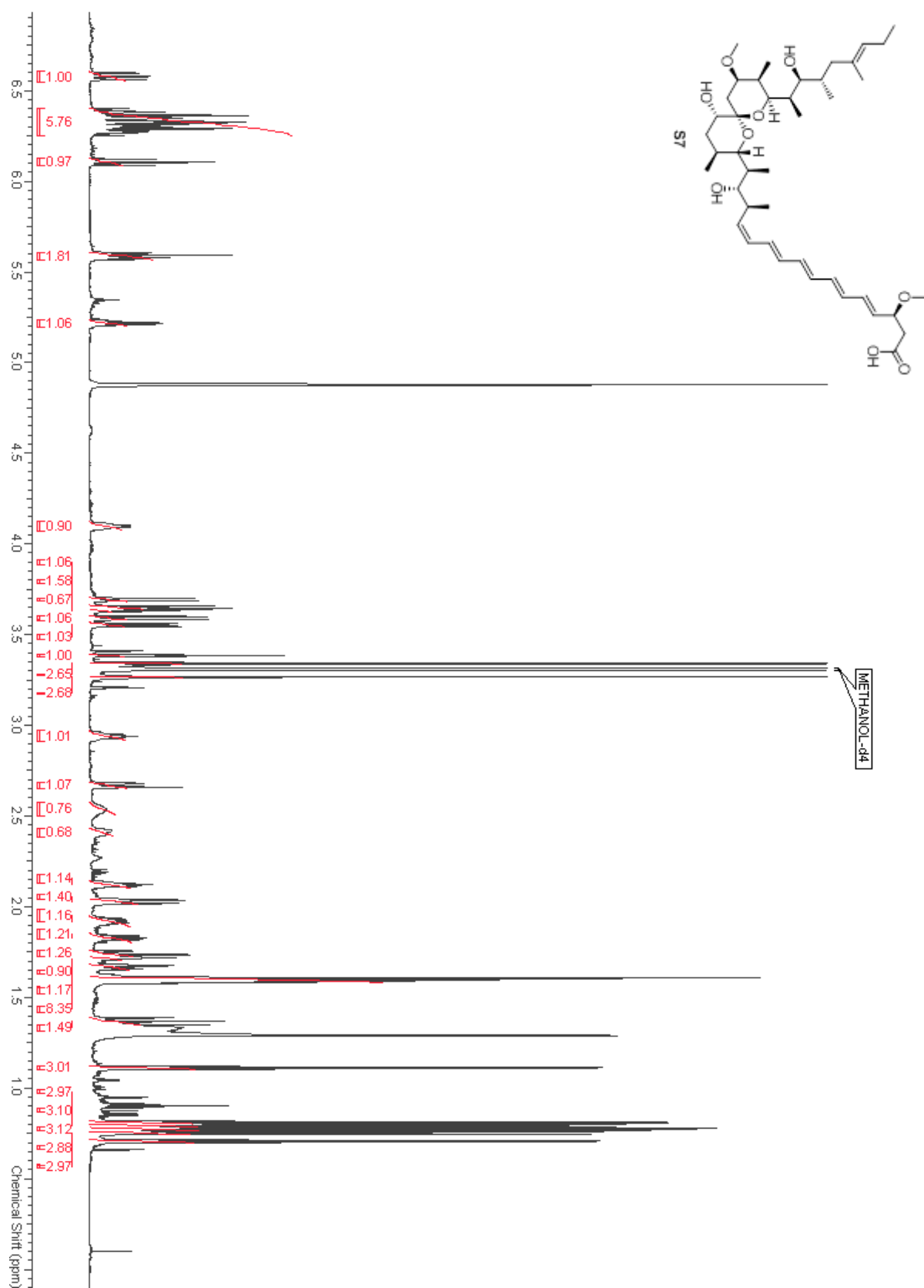
^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien J **S6** (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz).

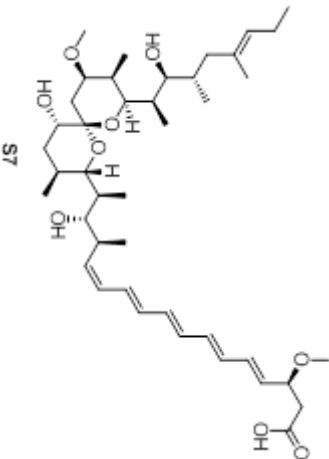


^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien J **S6** (^1H : 700 MHz).

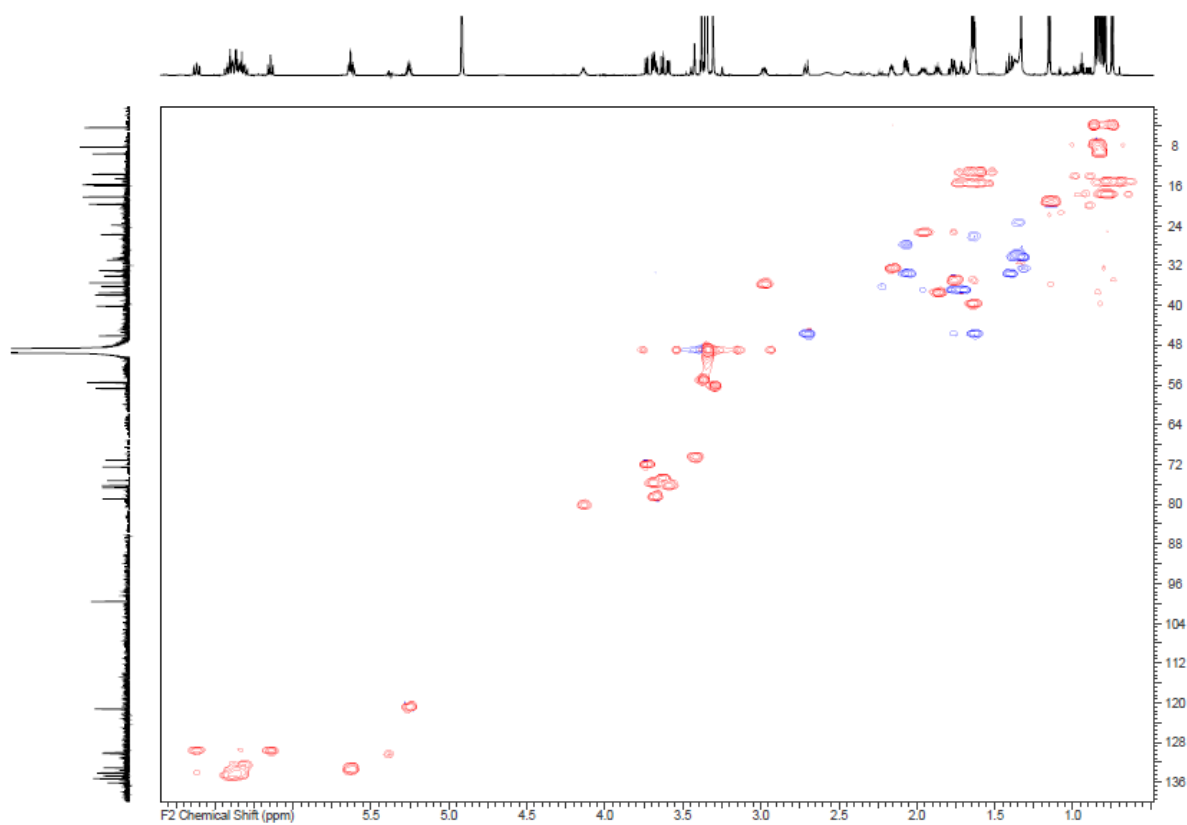


^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien J S6 (^1H : 900 MHz, kleine spektrale Weite).

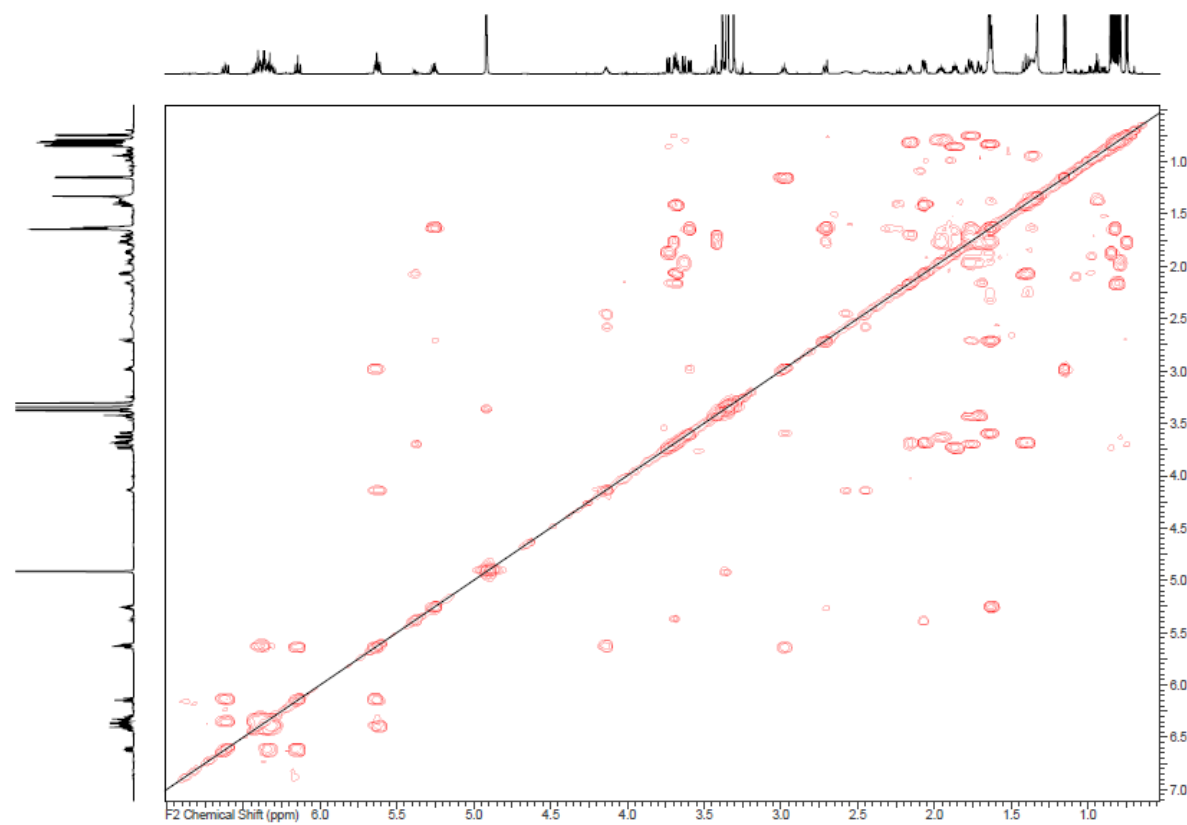




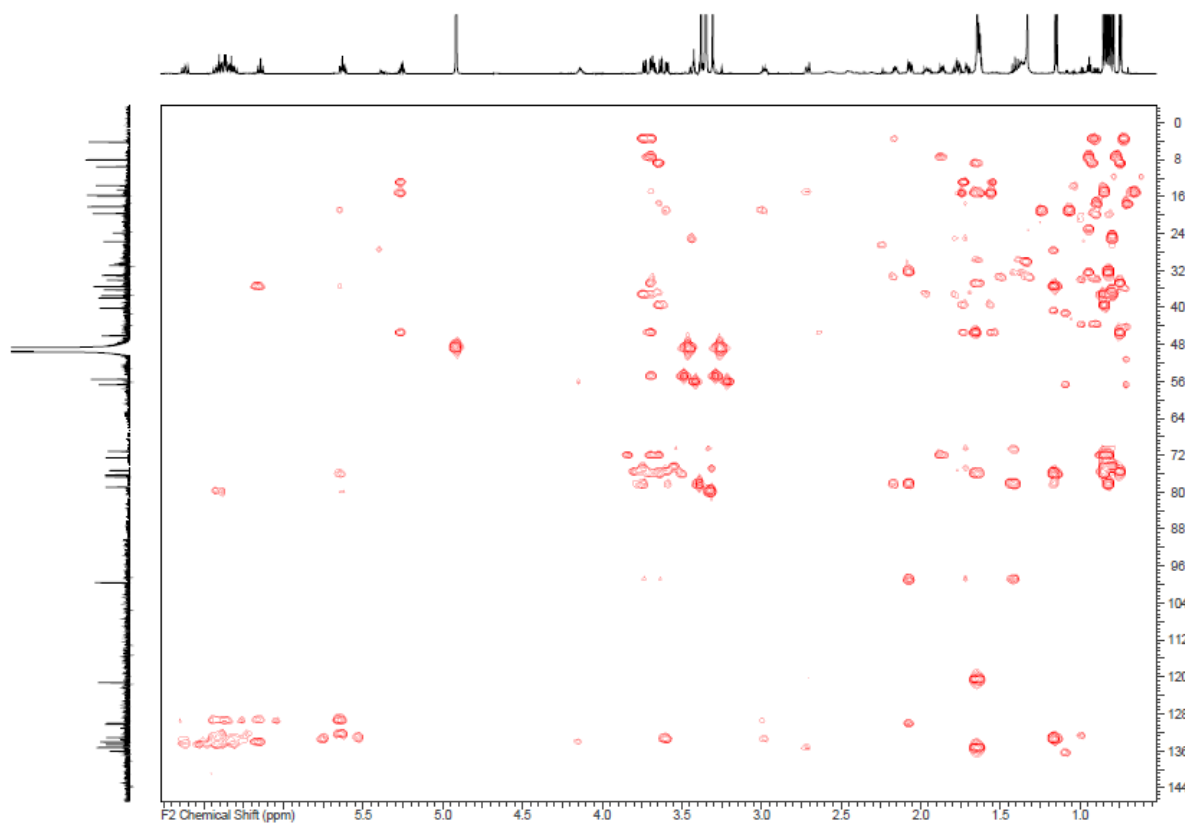
238



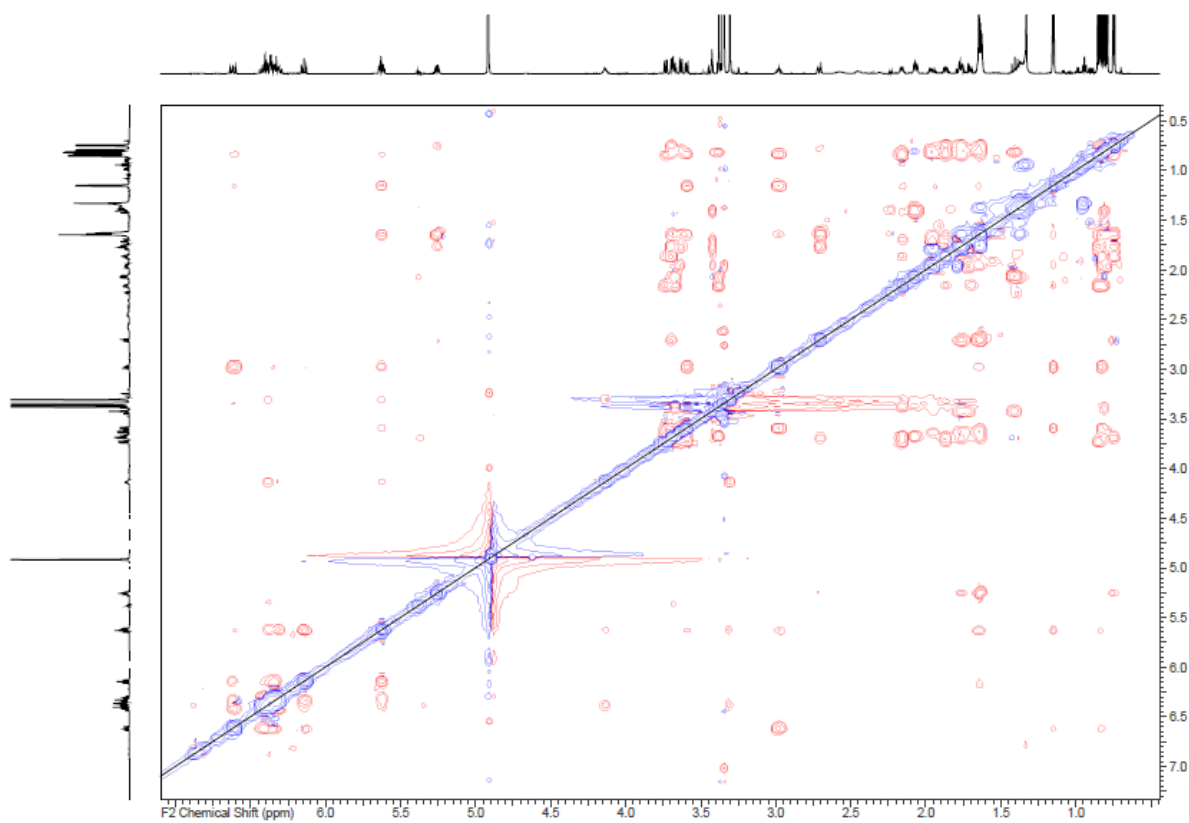
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien K **S7** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



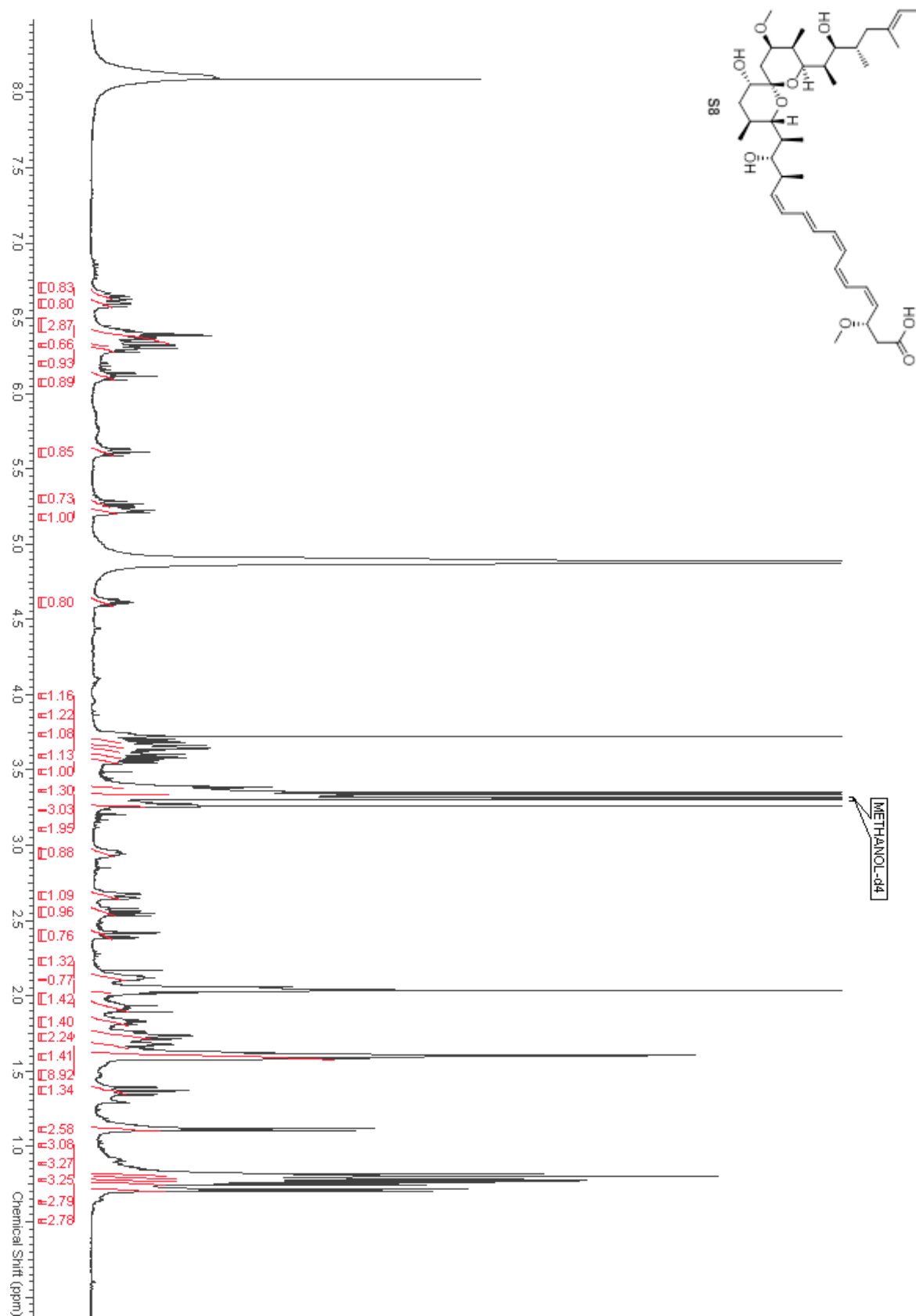
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum Spirangien K **S7** (^1H : 700 MHz).



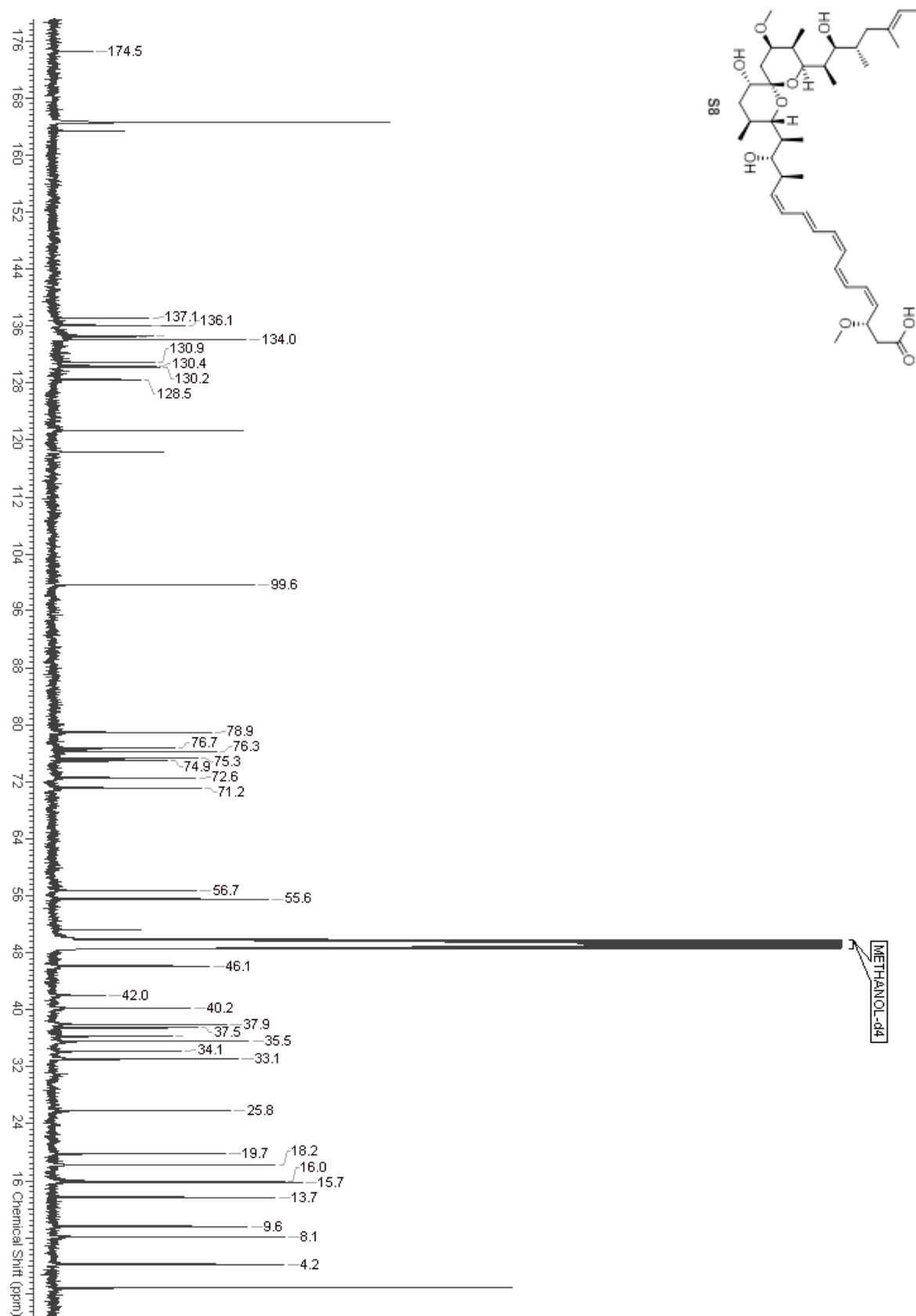
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien K **S7** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



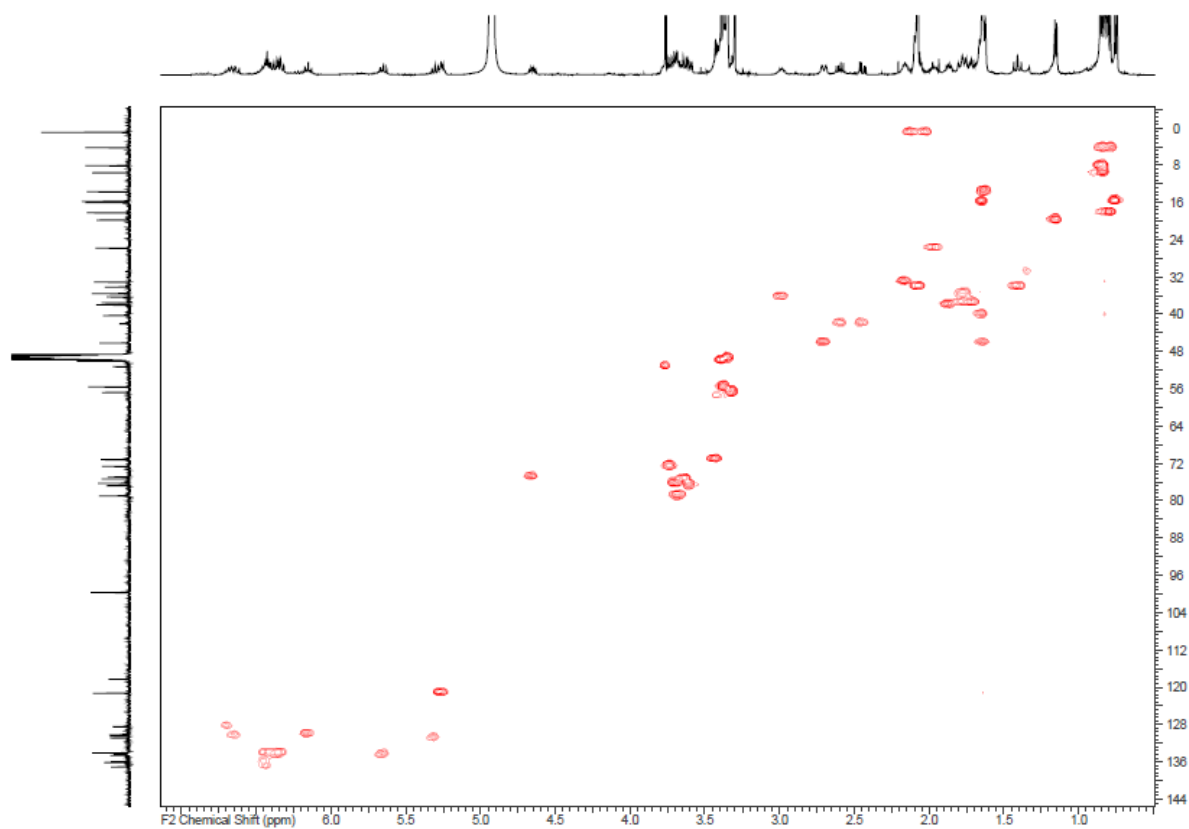
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien K **S7** (^1H : 700 MHz).



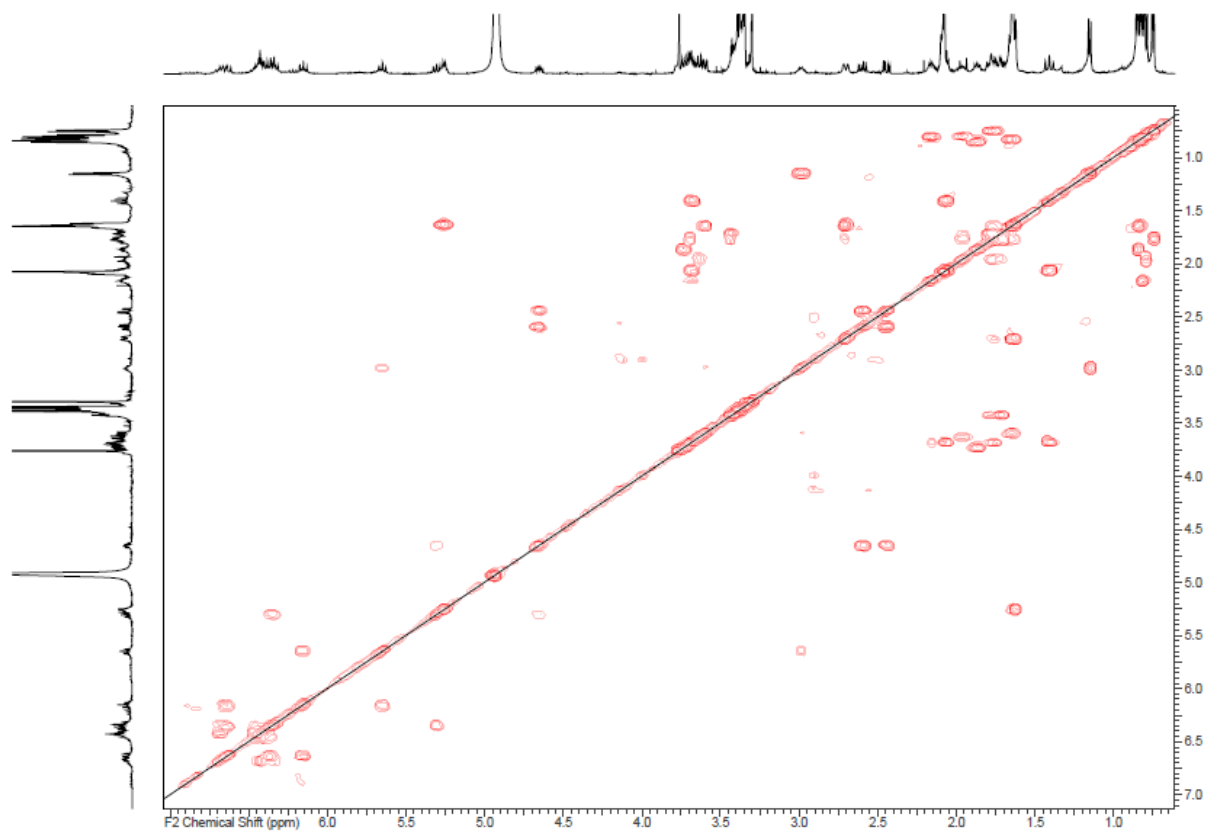
¹H-NMR-Spektrum Spirangien L S8 (700 MHz, CD₃OD).



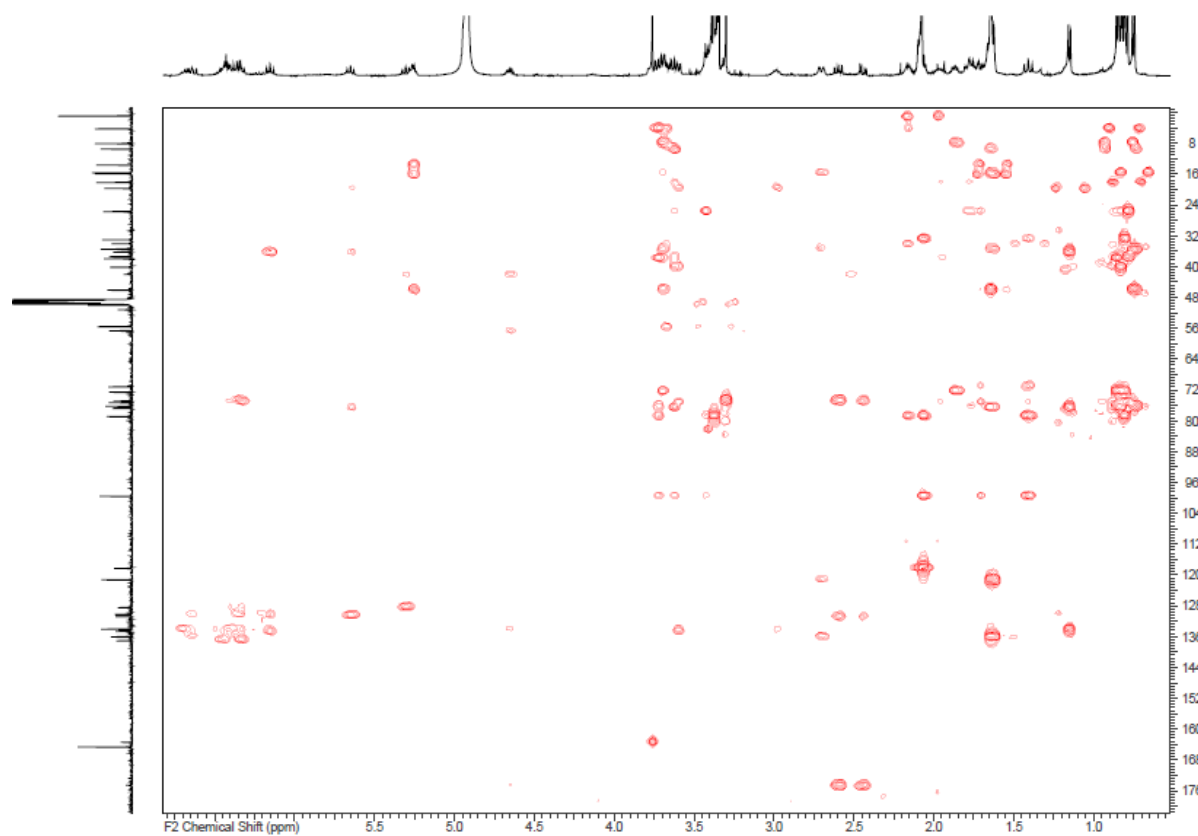
¹³C-NMR-Spektrum Spirangien L S8 (126 MHz, CD₃OD).



^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien L **S8** (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 MHz).

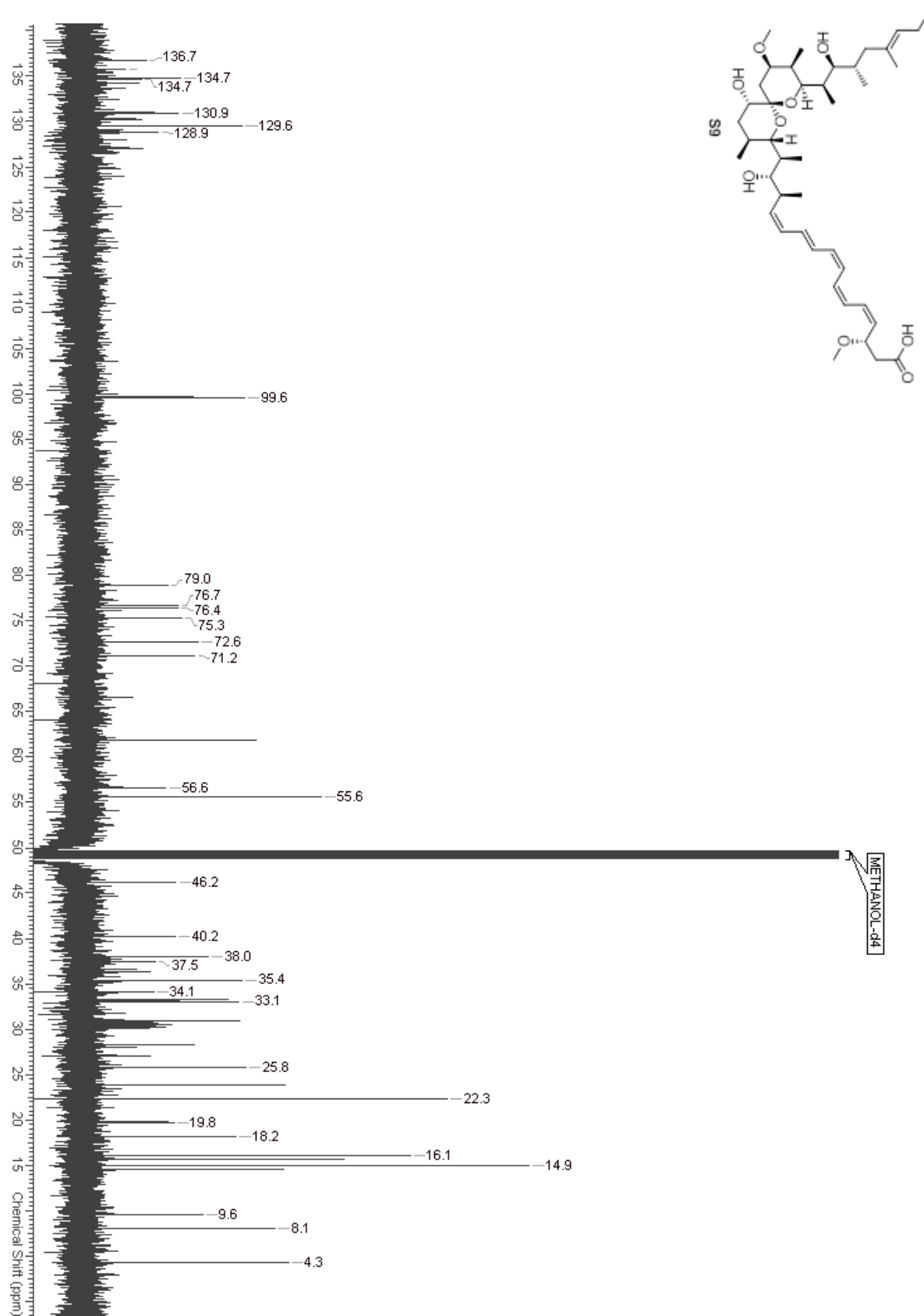


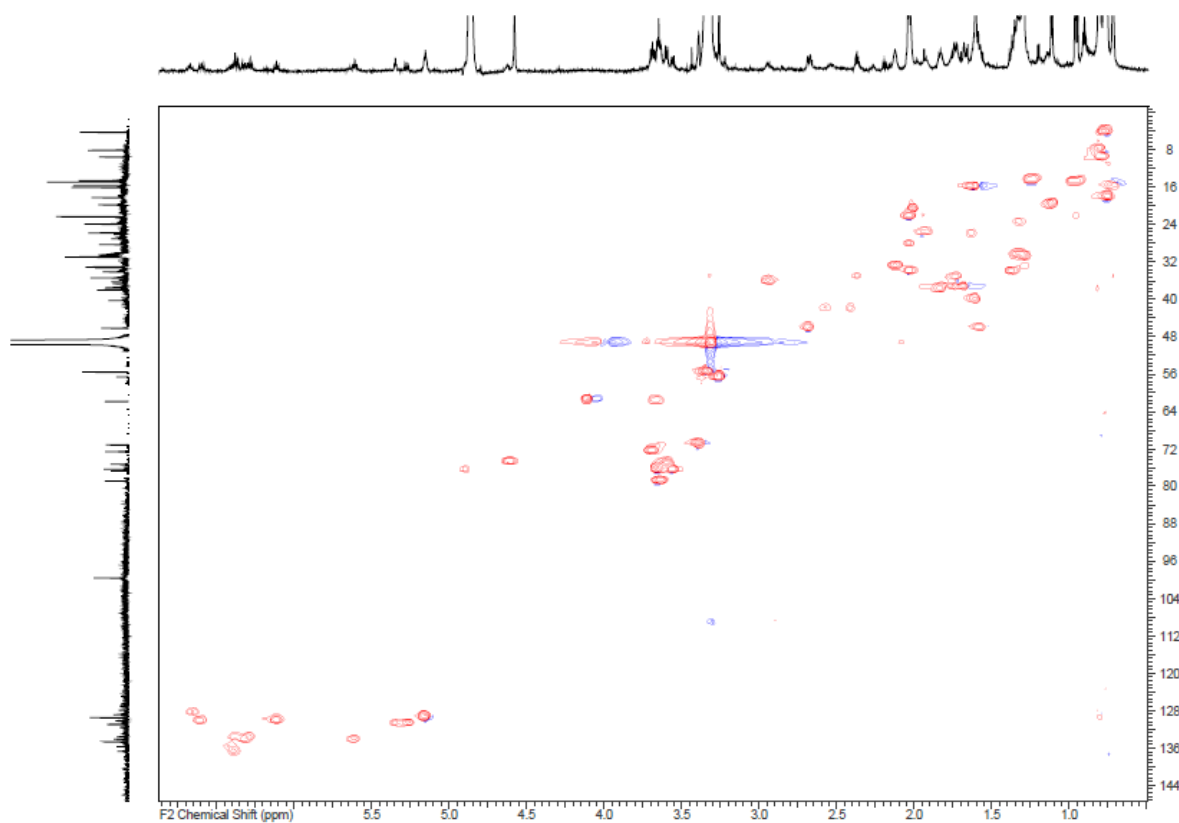
^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien L **S8** (^1H : 700 MHz).



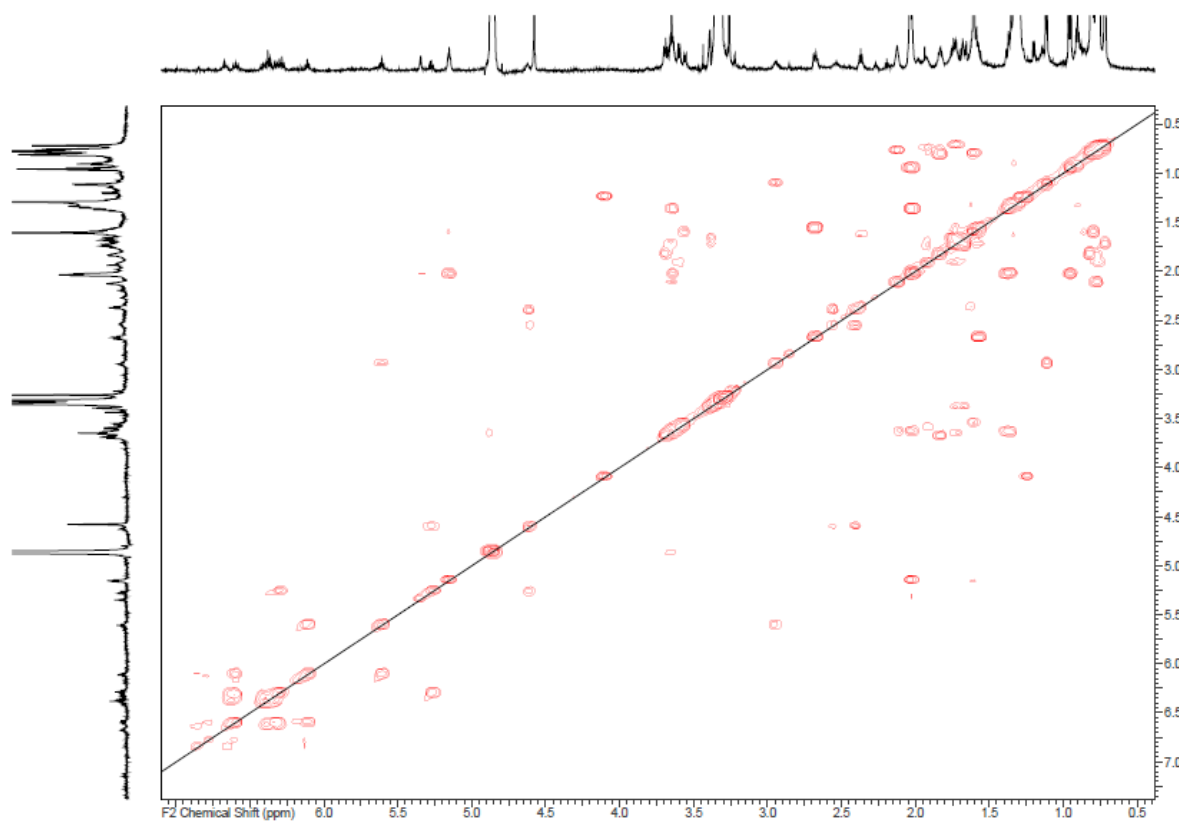
^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien L **S8** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



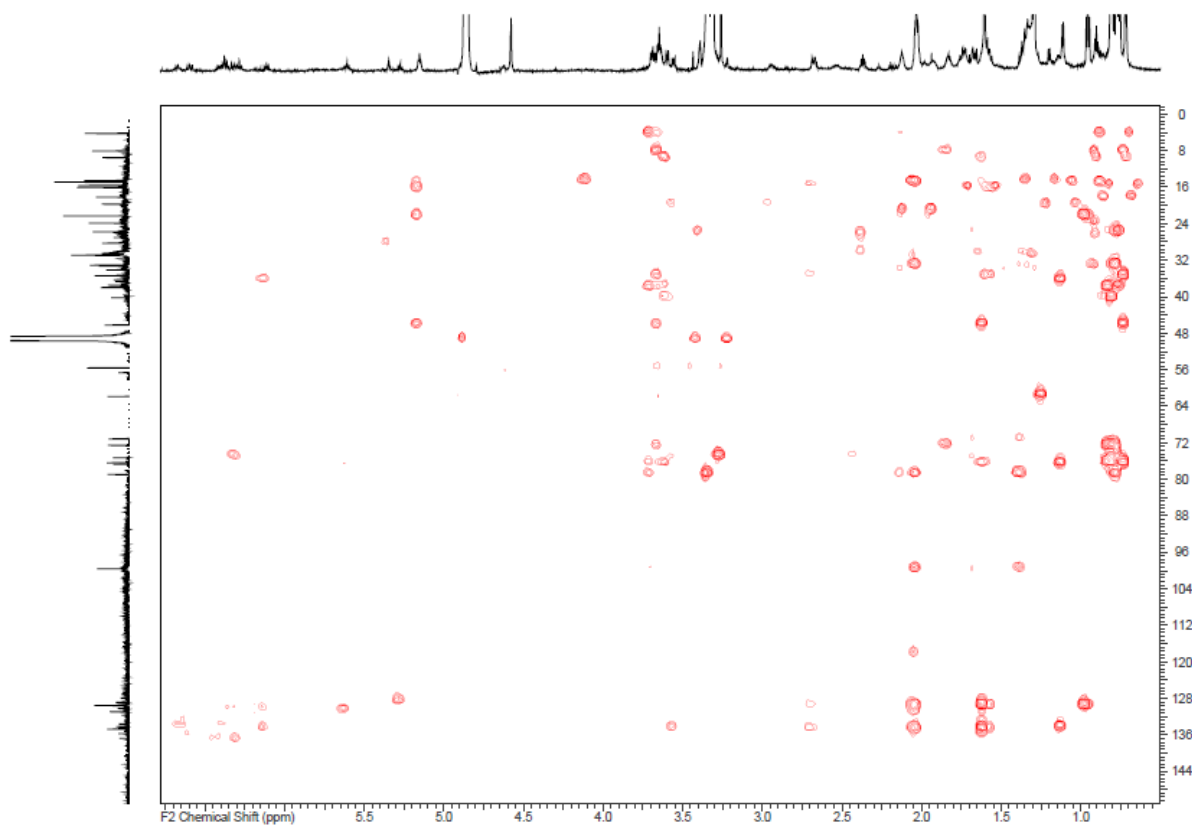
¹³C-NMR-Spektrum Spirangien M **S9** (176 MHz, CD₃OD).



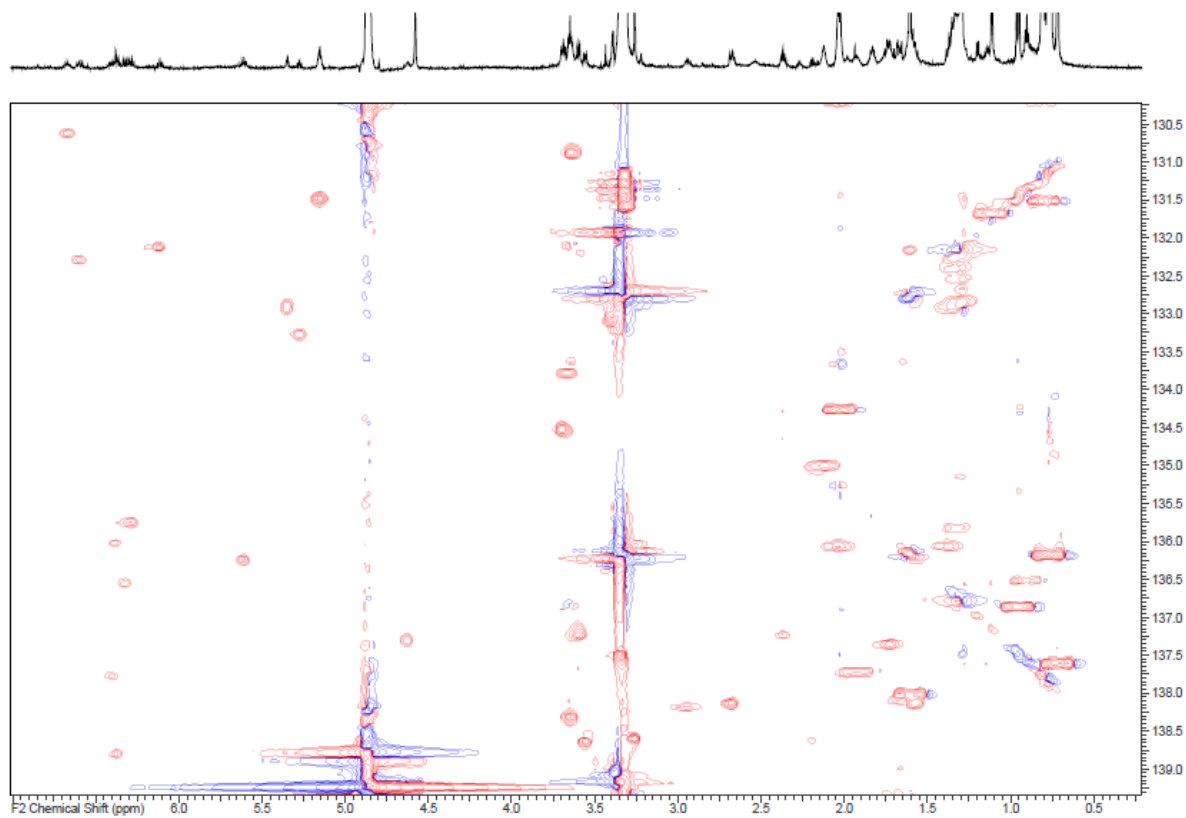
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien M **S9** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum Spirangien M **S9** (^1H : 700 MHz).

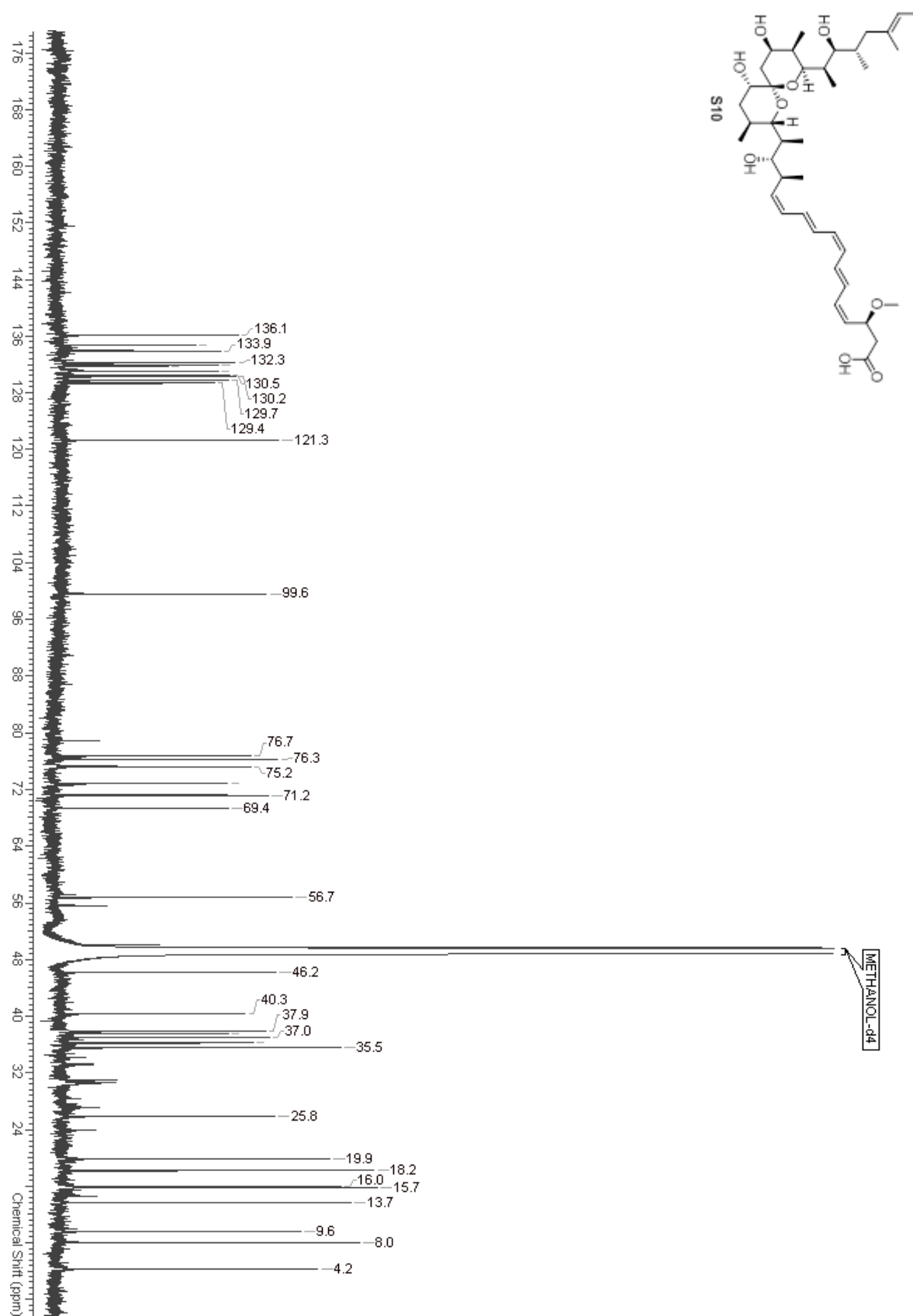


$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien M **S9** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

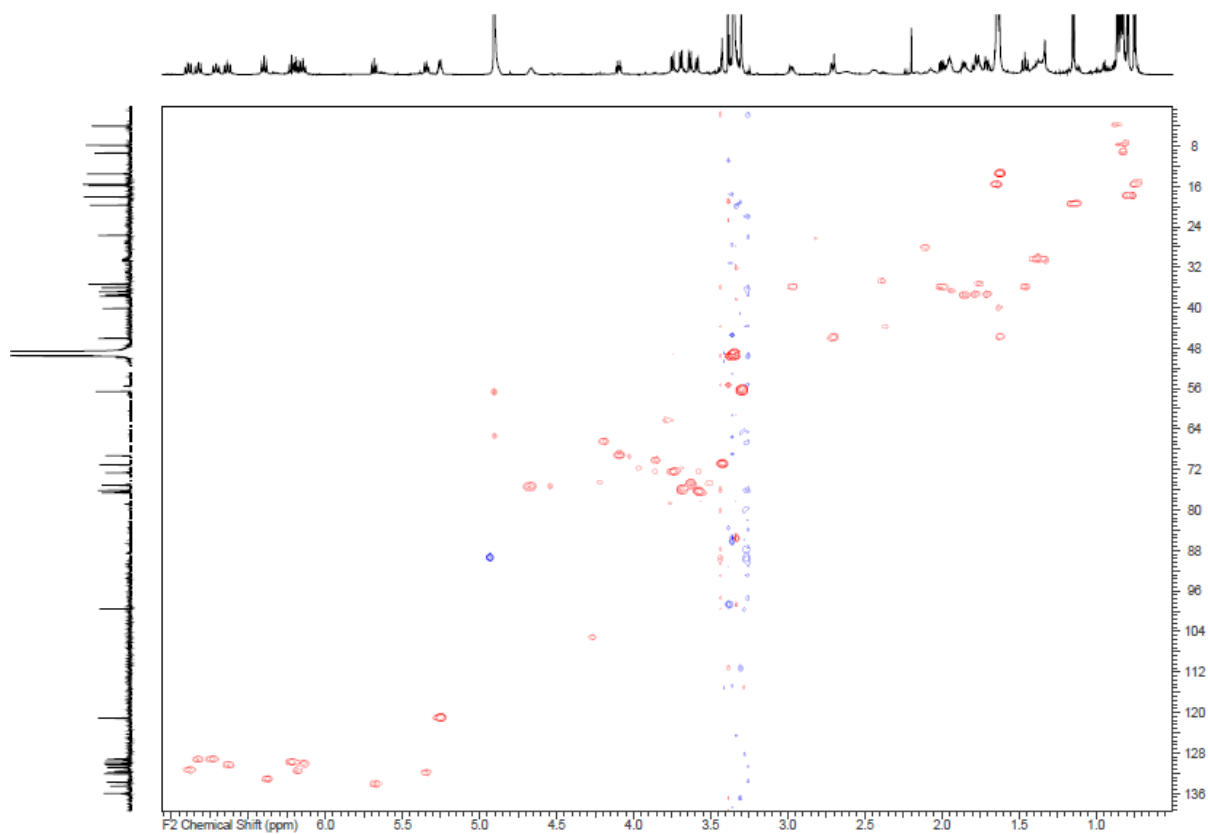


$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien M **S9** (^1H : 900 MHz, kleine spektrale Weite).

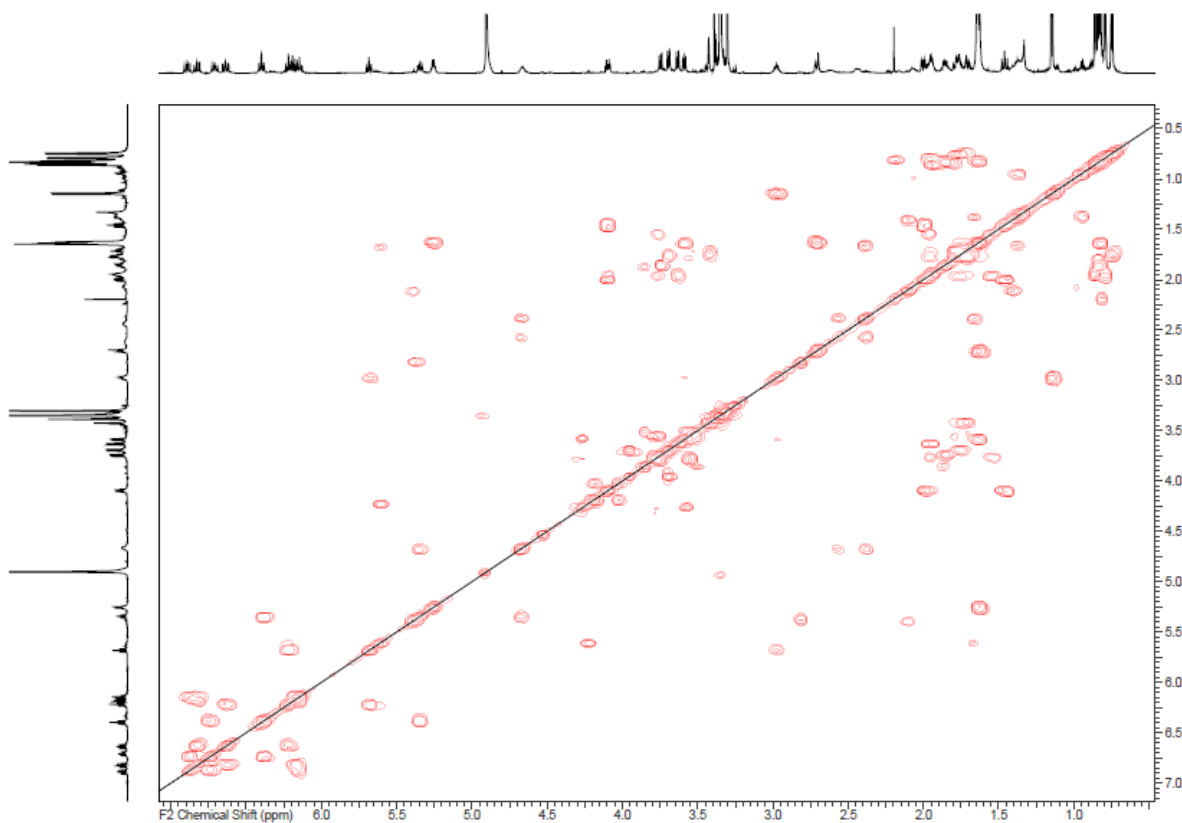




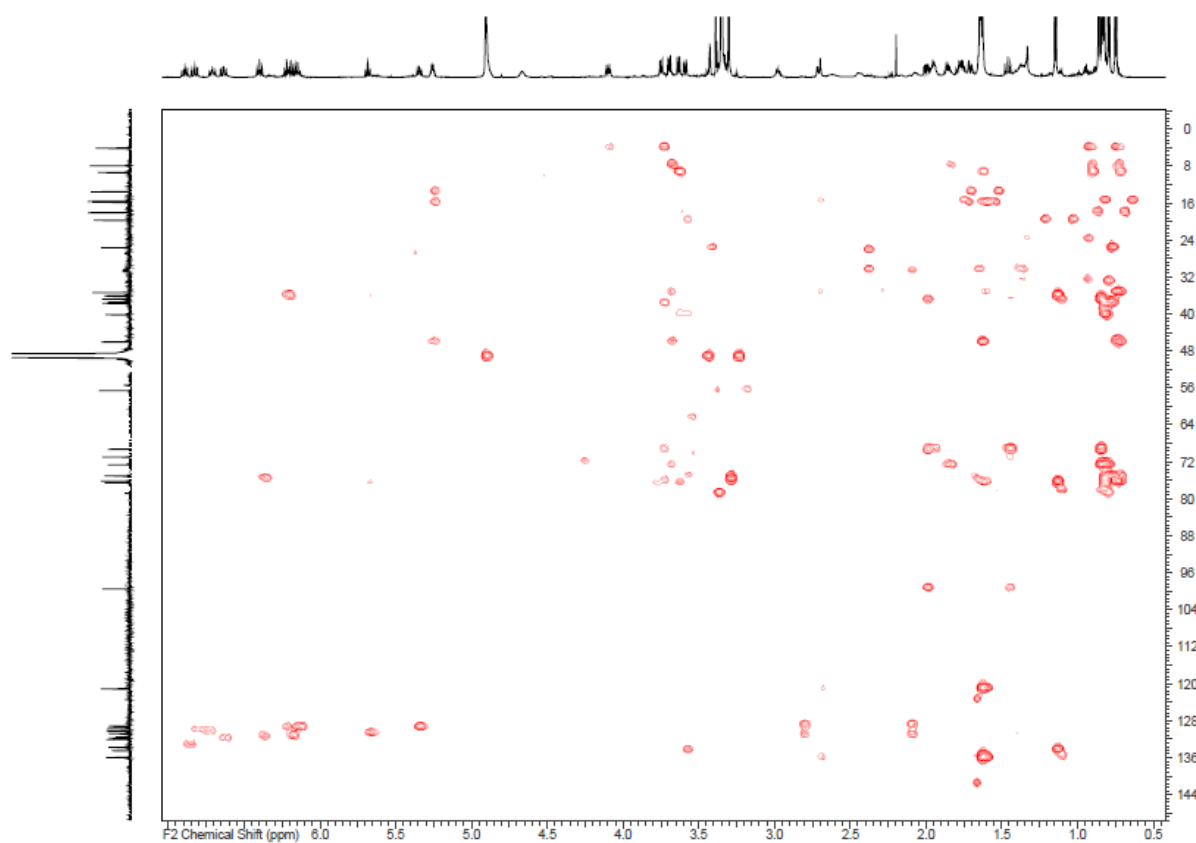
¹³C-NMR-Spektrum Spirangien N **S10** (176 MHz, CD₃OD).



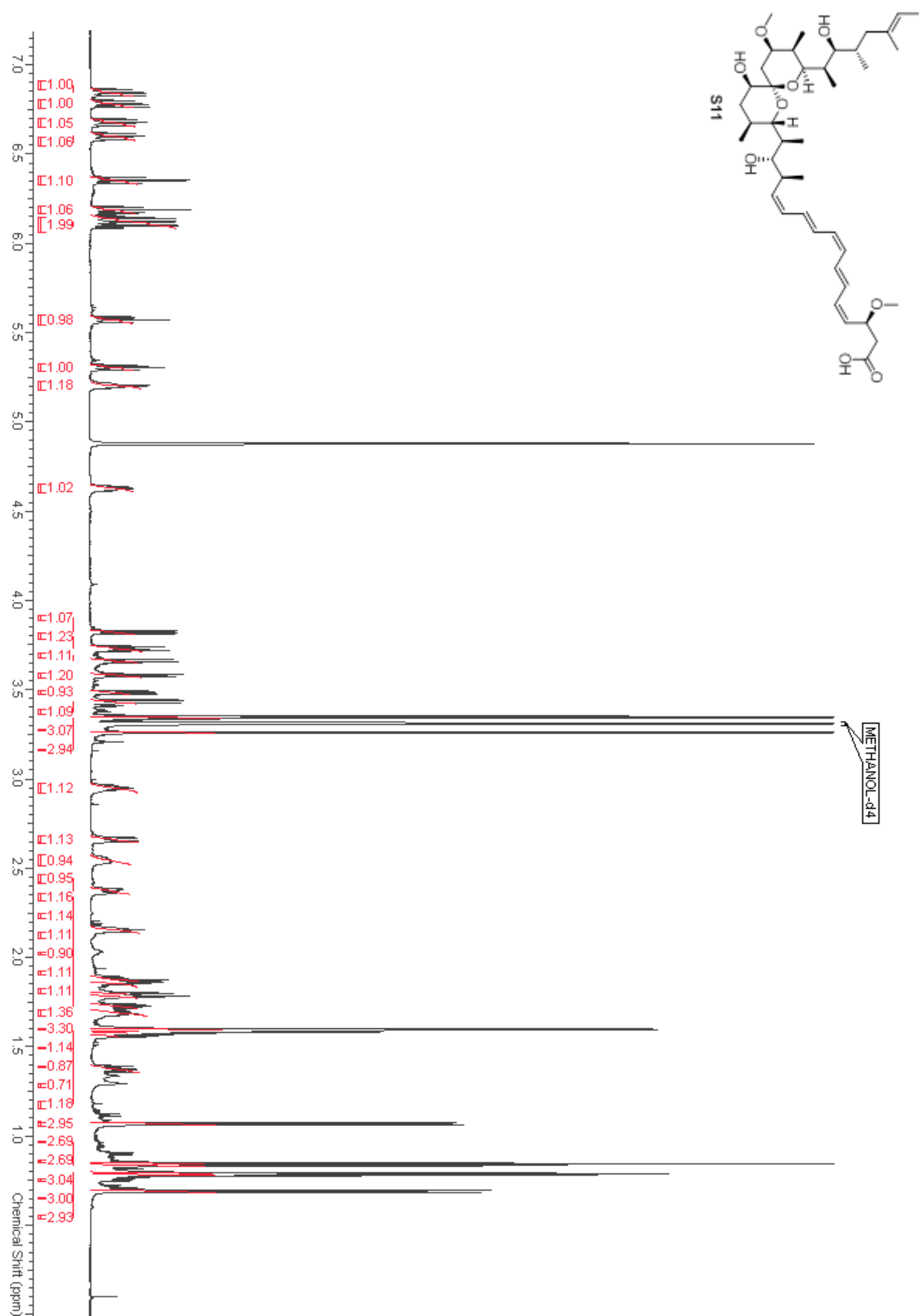
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien N **S10** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



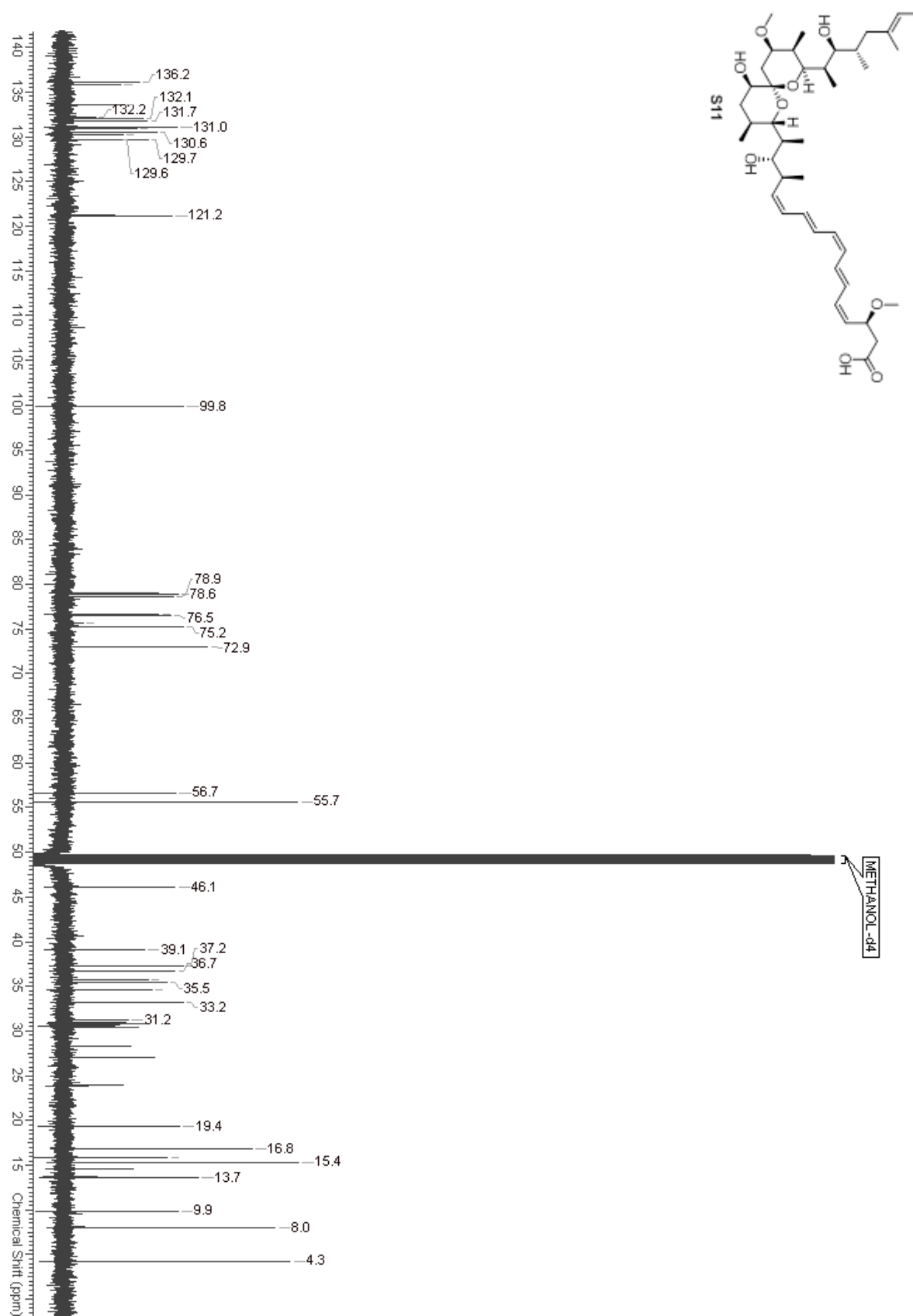
^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum Spirangien N **S10** (^1H : 700 MHz).



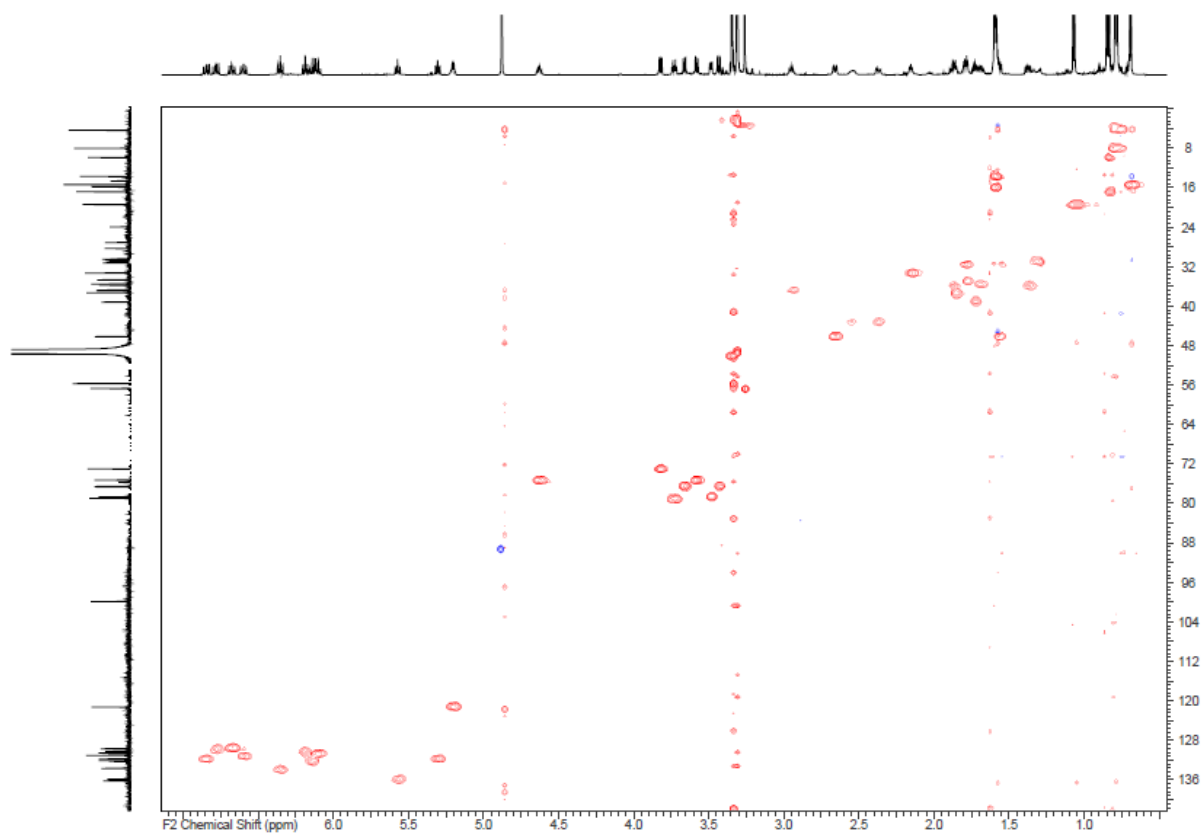
^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien N **S10** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



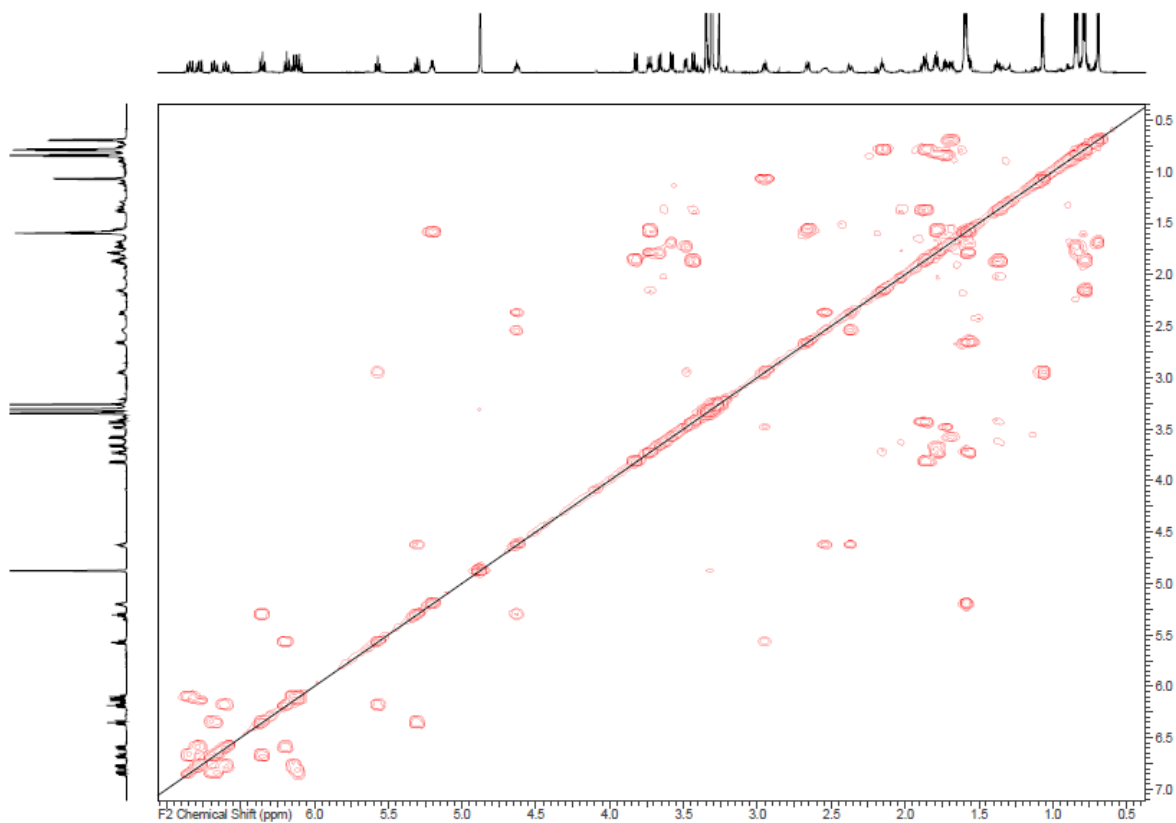
^1H -NMR-Spektrum Spirangien O S11 (700 MHz, CD_3OD).



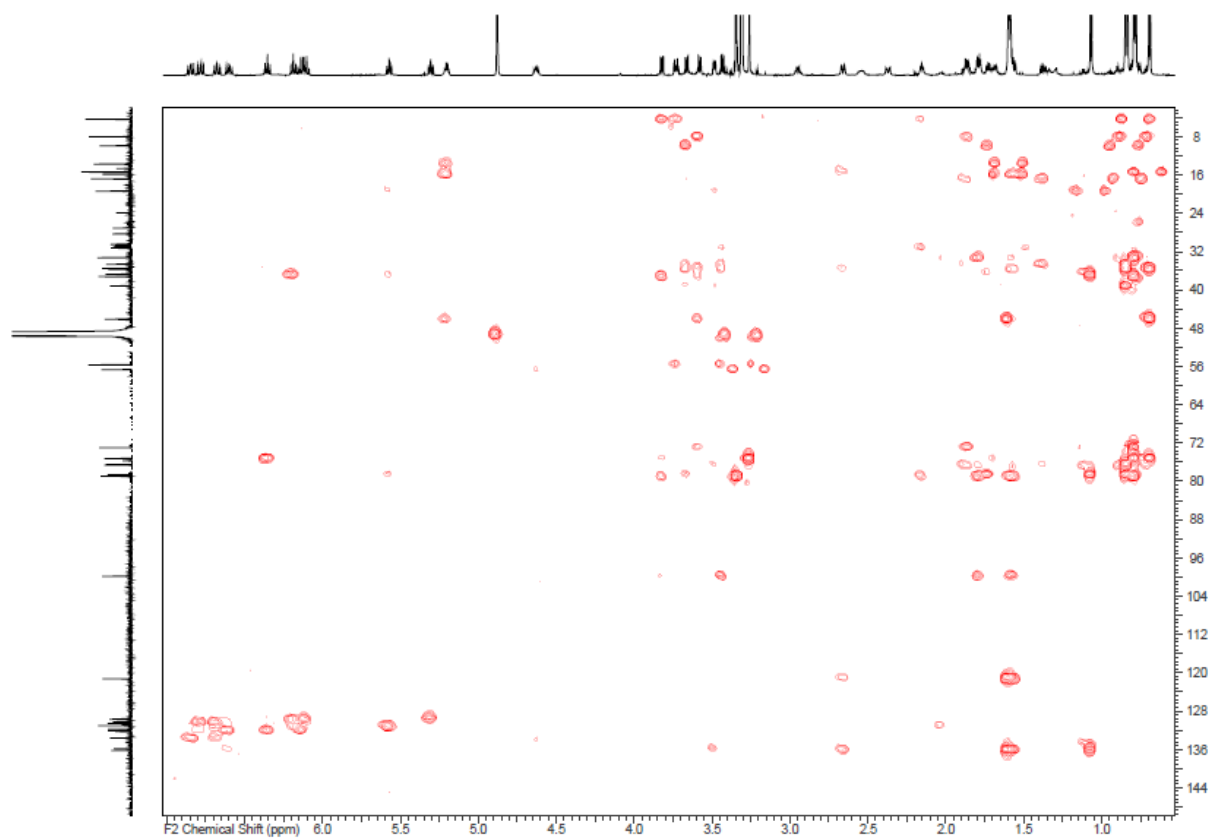
¹³C-NMR-Spektrum Spirangien O **S11** (176 MHz, CD₃OD).



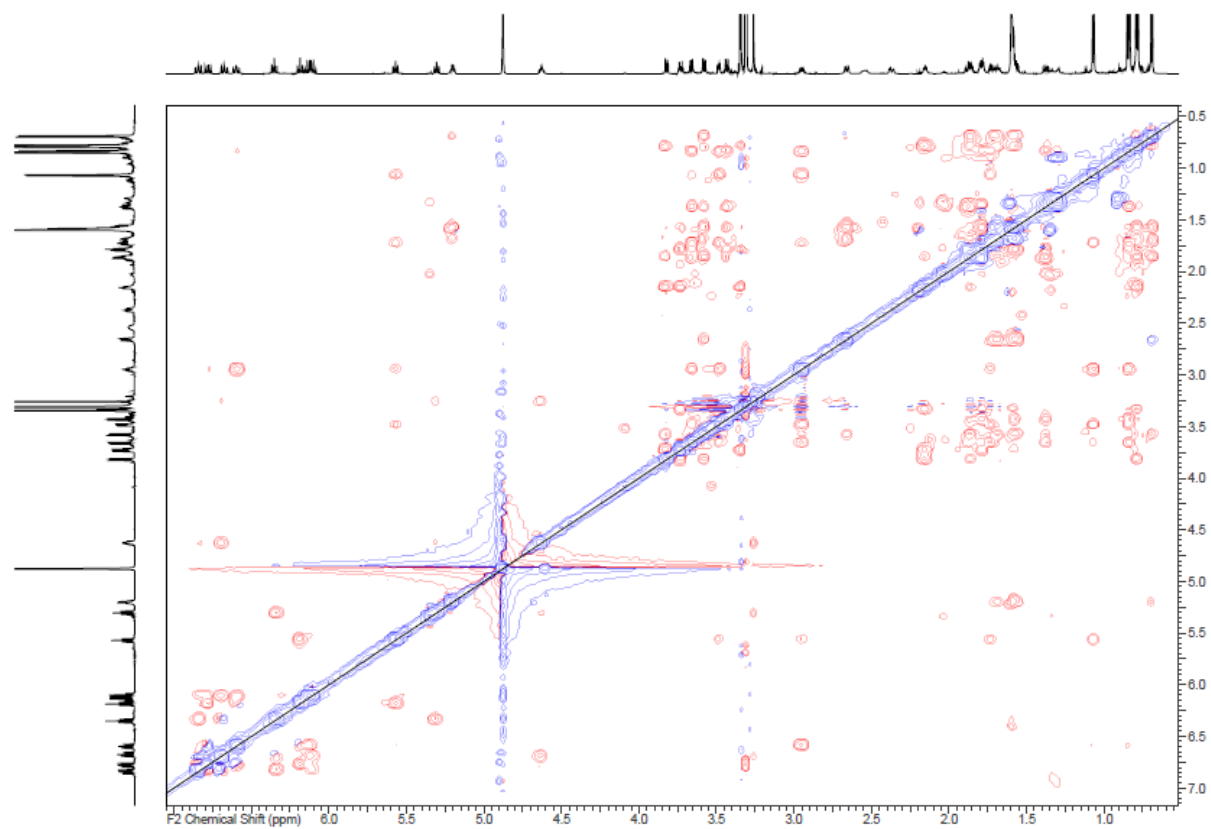
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien O **S11** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



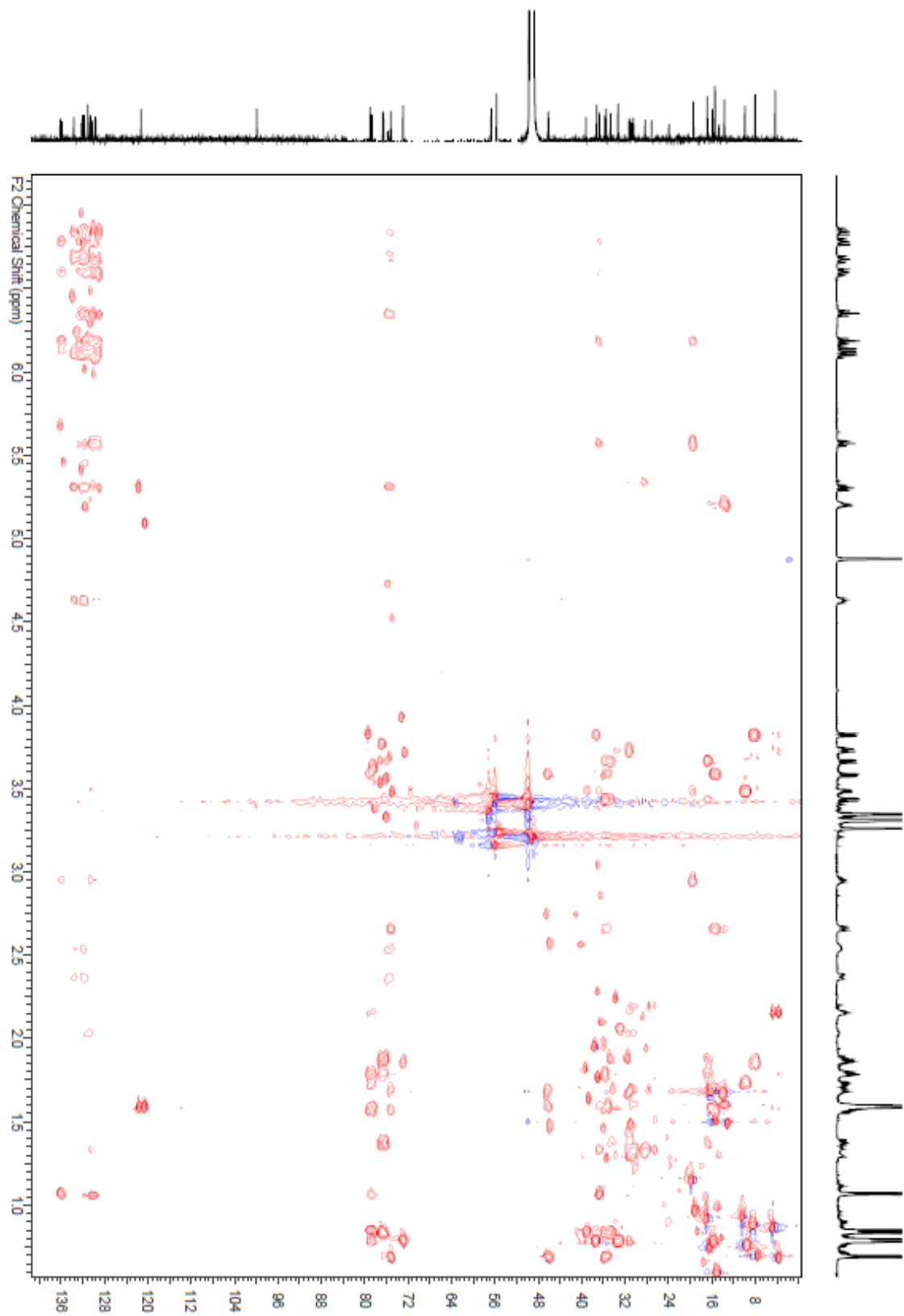
^1H , ^{13}C -COSY-NMR-Spektrum Spirangien O **S11** (^1H : 700 MHz).



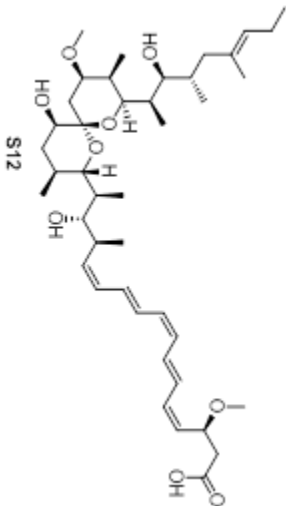
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien O **S11** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien O **S11** (^1H : 700 MHz).

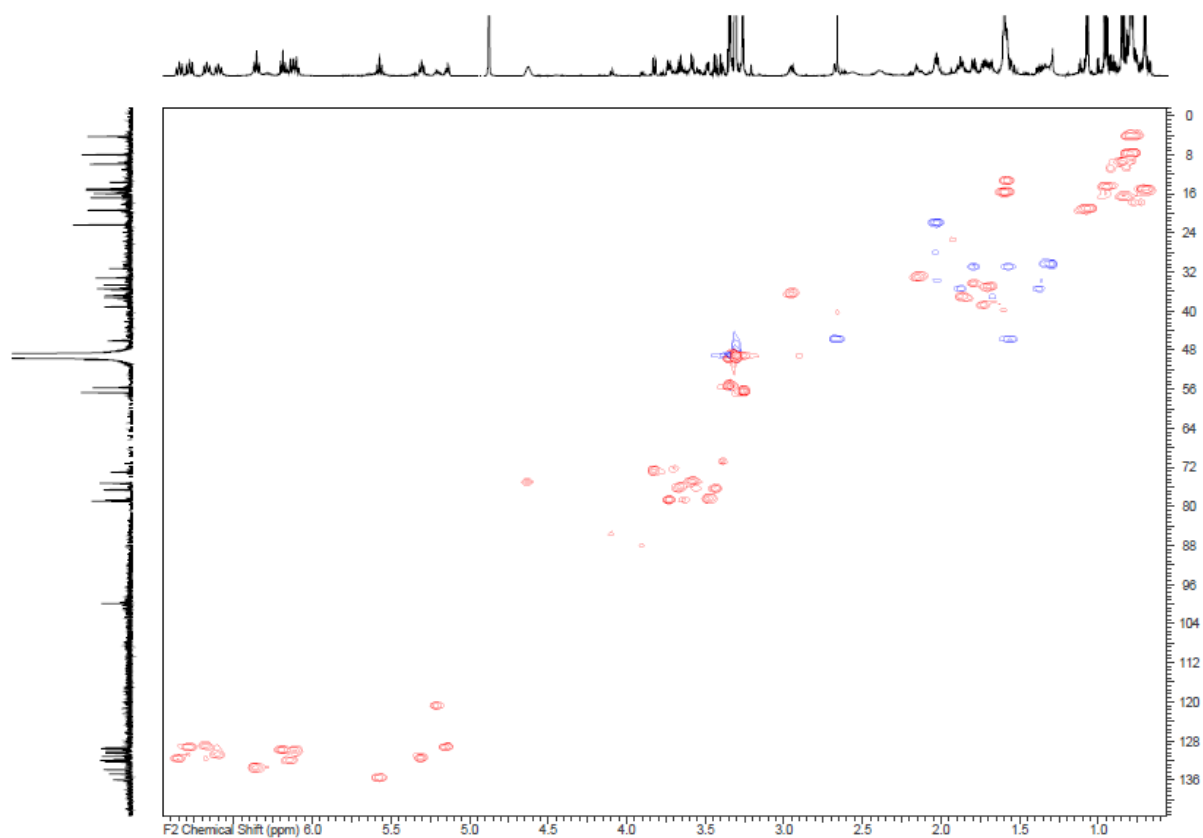


^1H , ^{13}C -HSQC-HECADE-NMR-Spektrum Spirangien O **S11** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

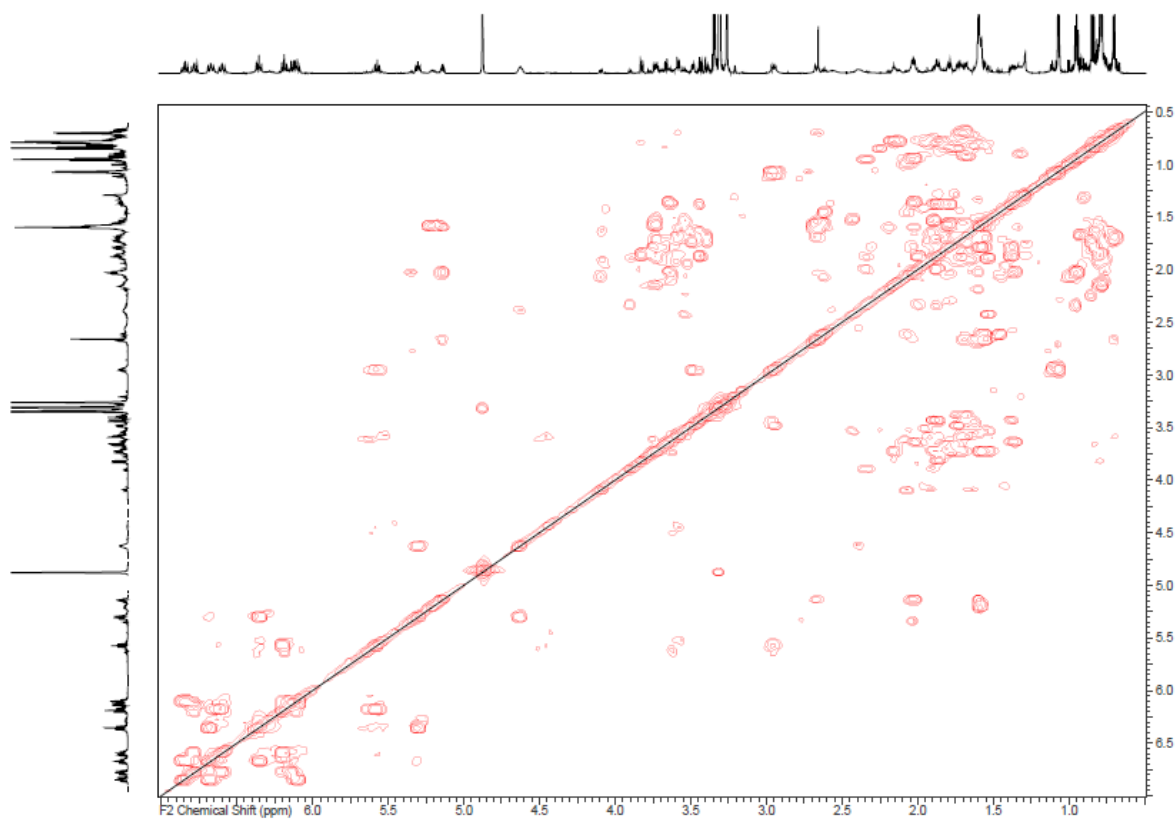


258

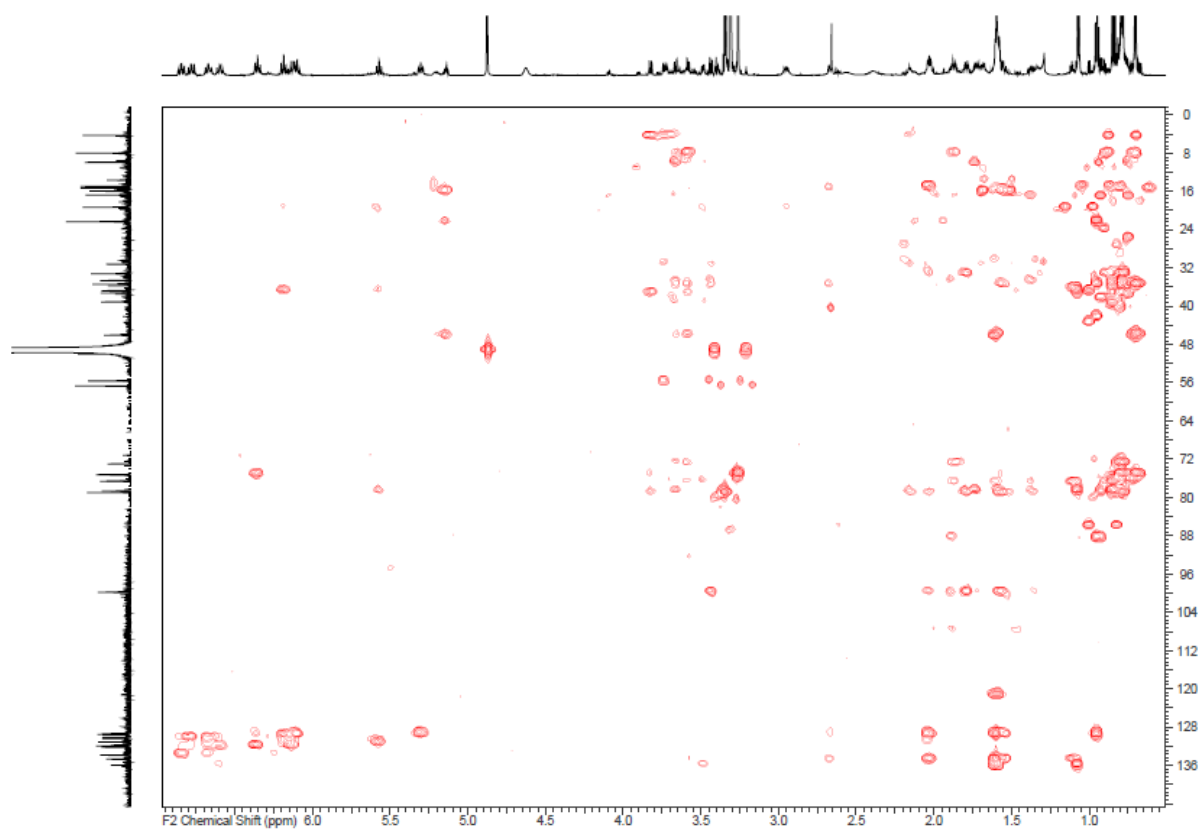




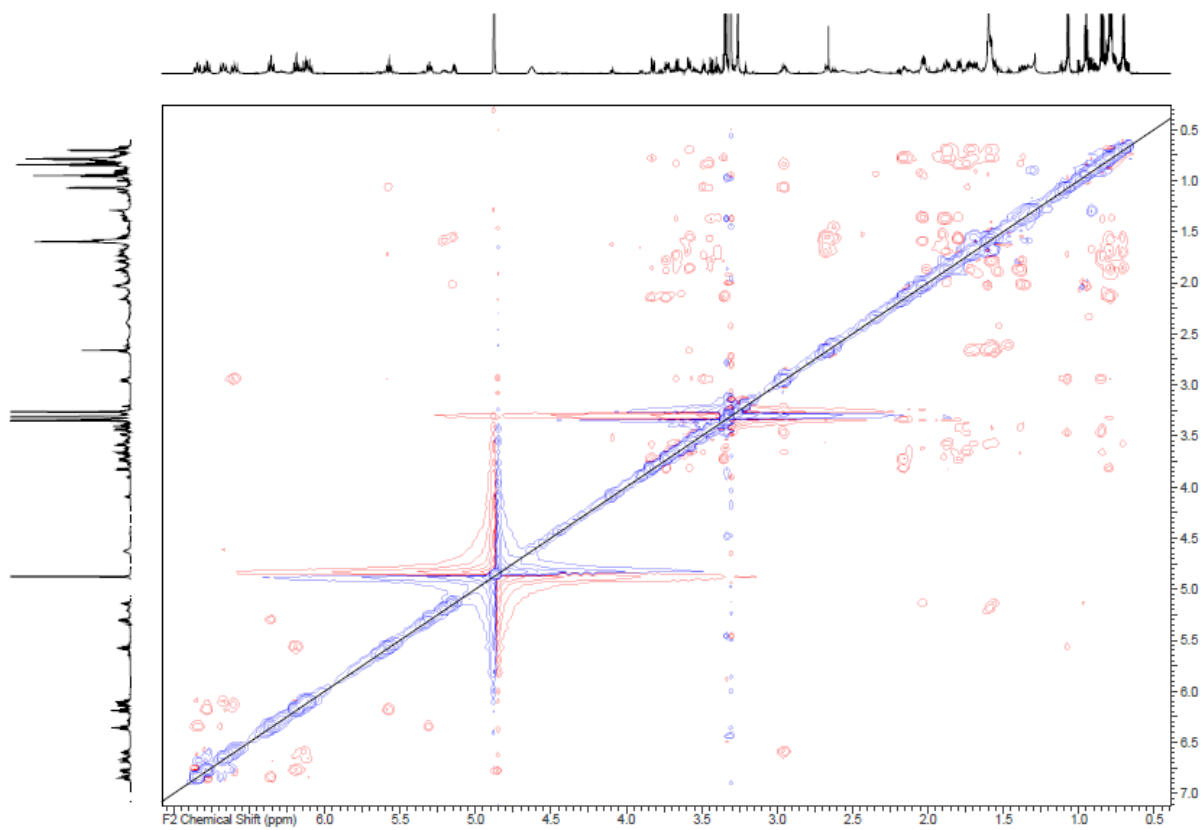
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien P **S12** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



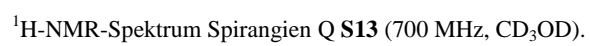
^1H , ^{13}C -COSY-NMR-Spektrum Spirangien P **S12** (^1H : 700 MHz).

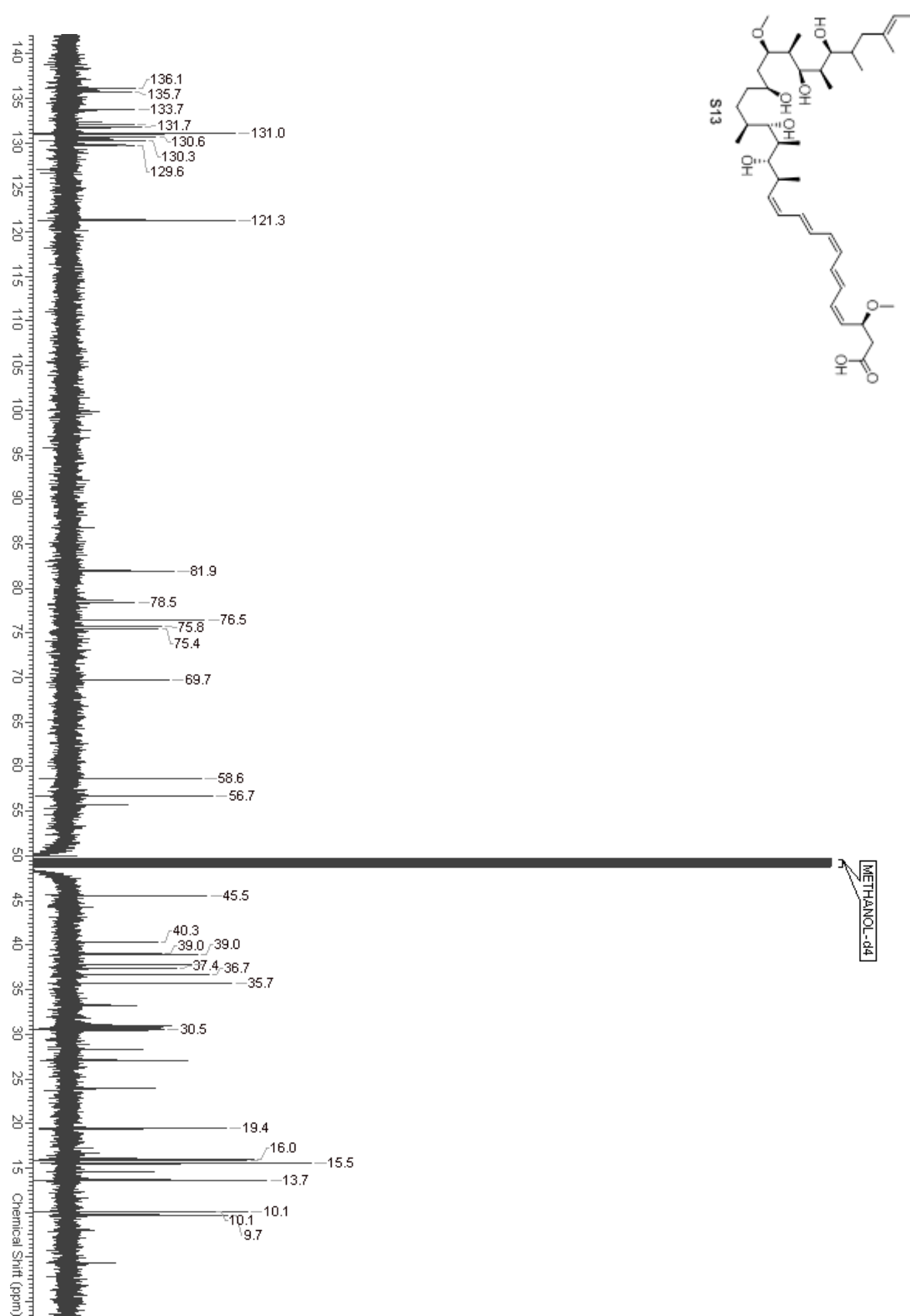


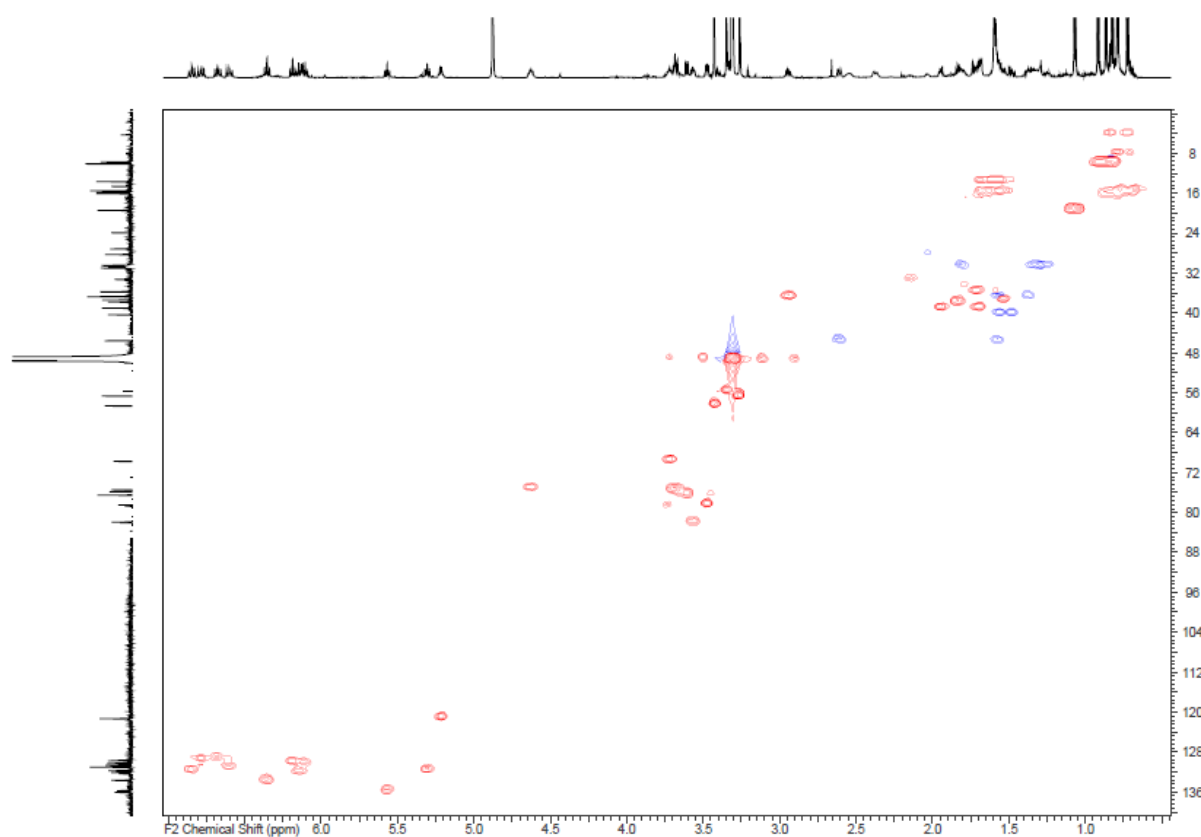
^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien P **S12** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



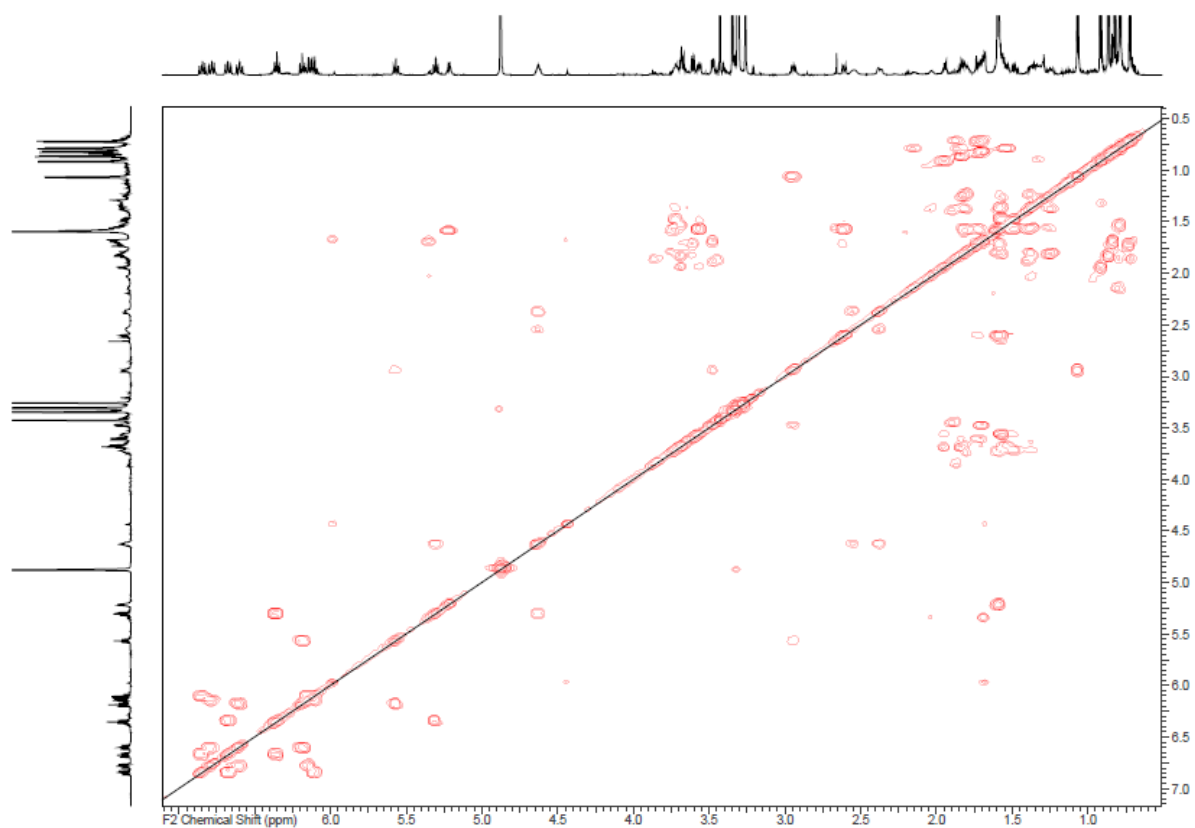
^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien P **S12** (^1H : 700 MHz).



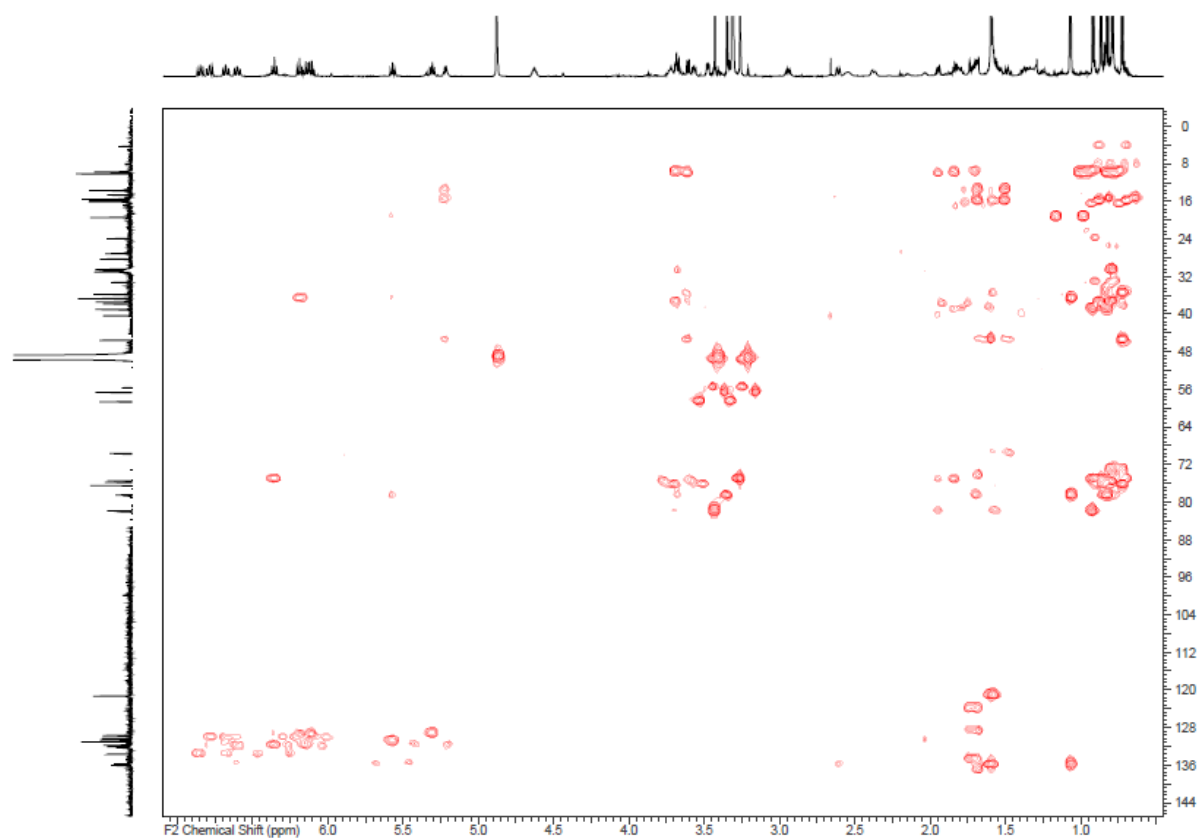
 ^{13}C -NMR-Spektrum Spirangien Q **S13** (176 MHz, CD_3OD).



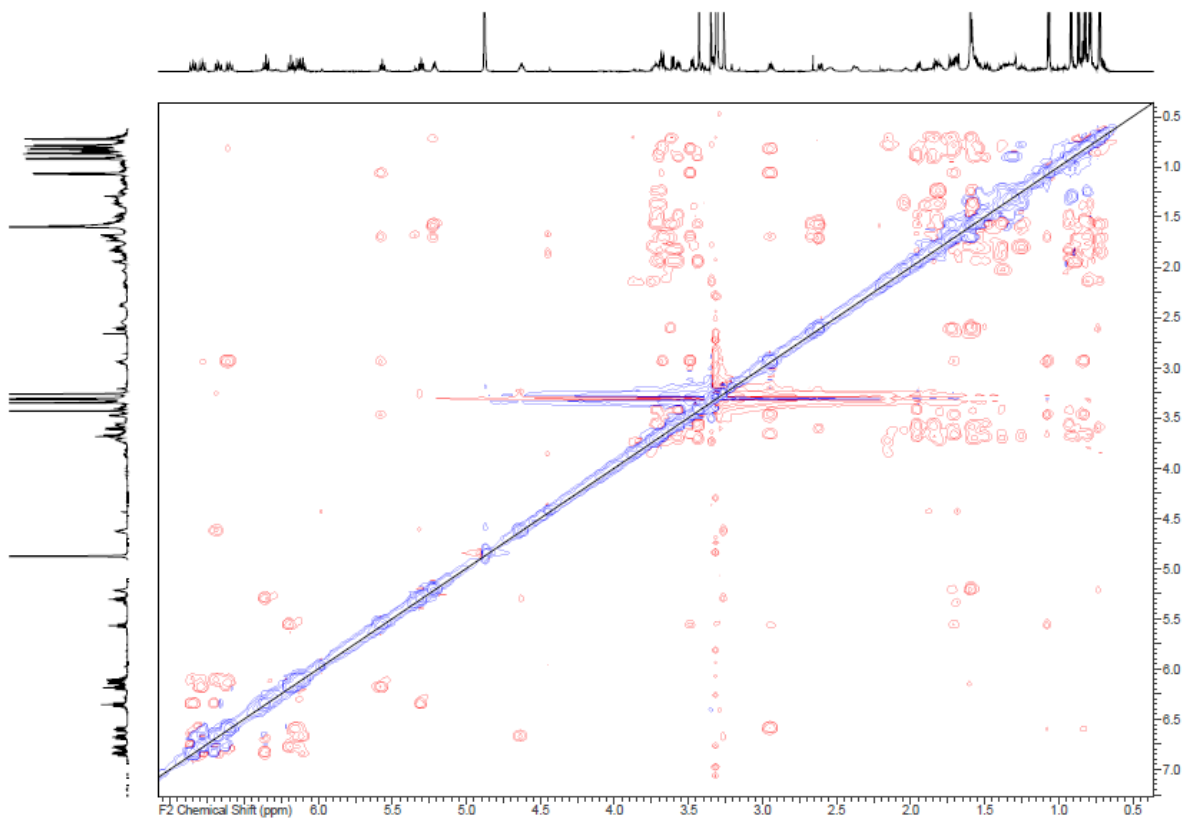
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum Spirangien Q **S13** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).



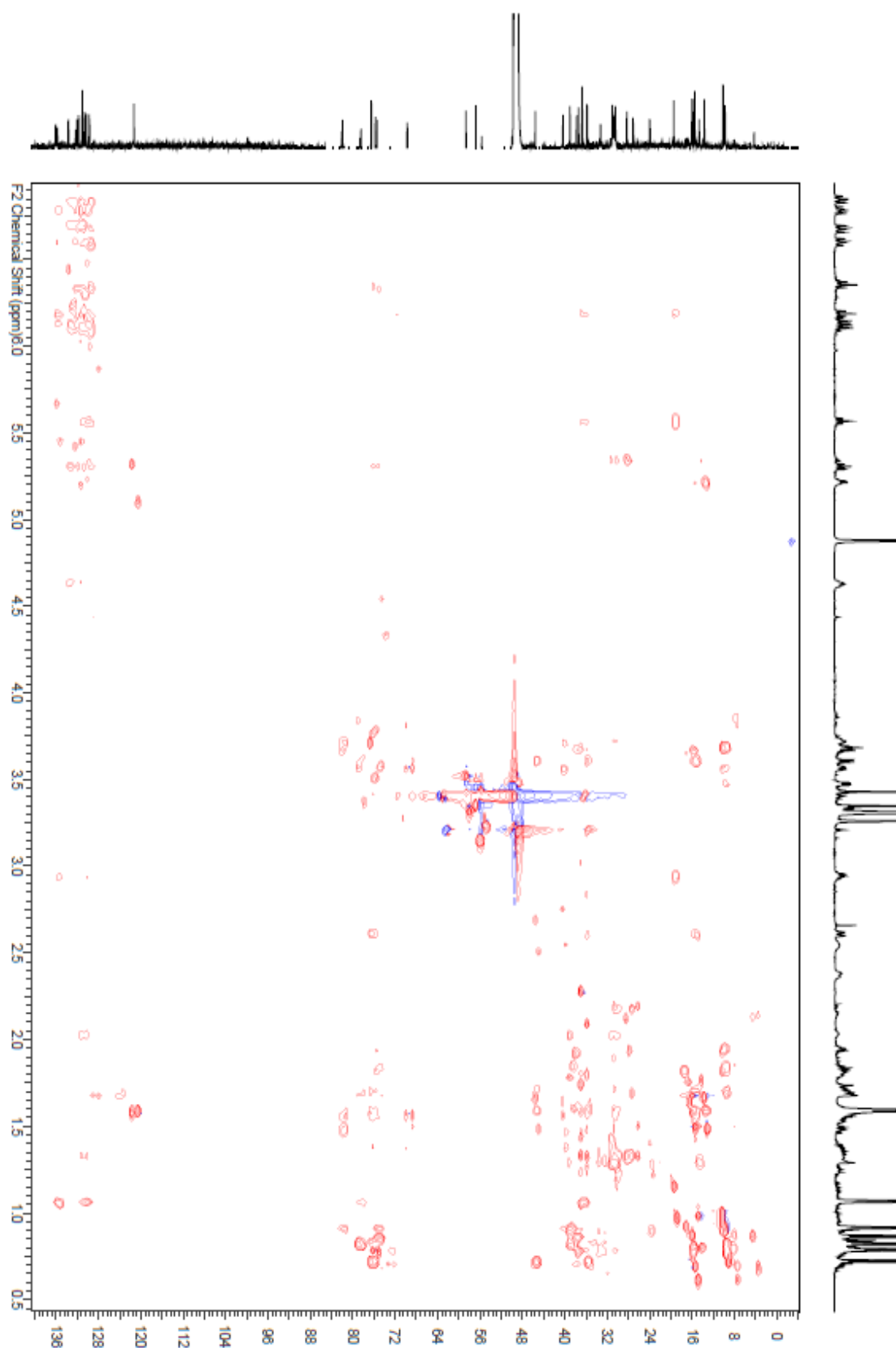
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum Spirangien Q **S13** (^1H : 700 MHz).



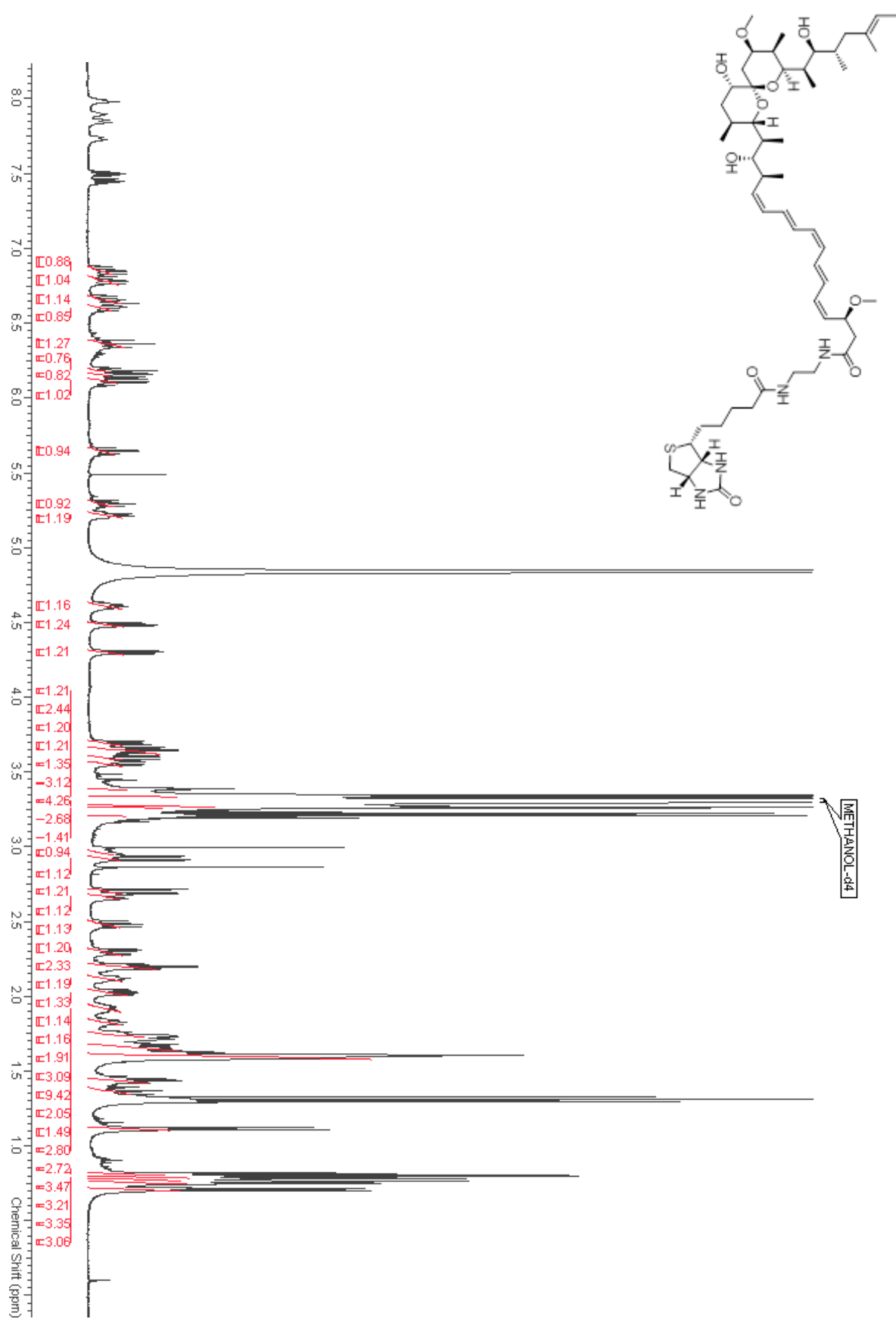
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-NMR-Spektrum Spirangien Q **S13** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

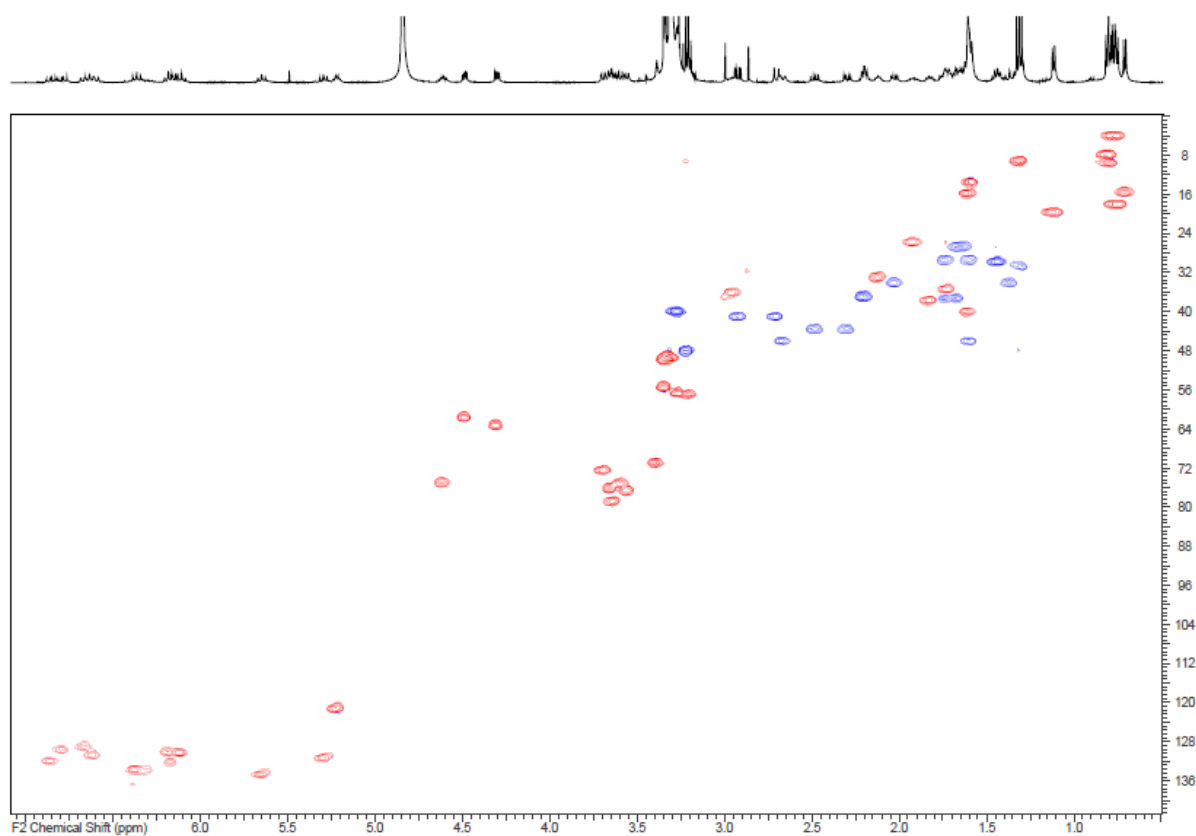


$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-NMR-Spektrum Spirangien Q **S13** (^1H : 700 MHz).

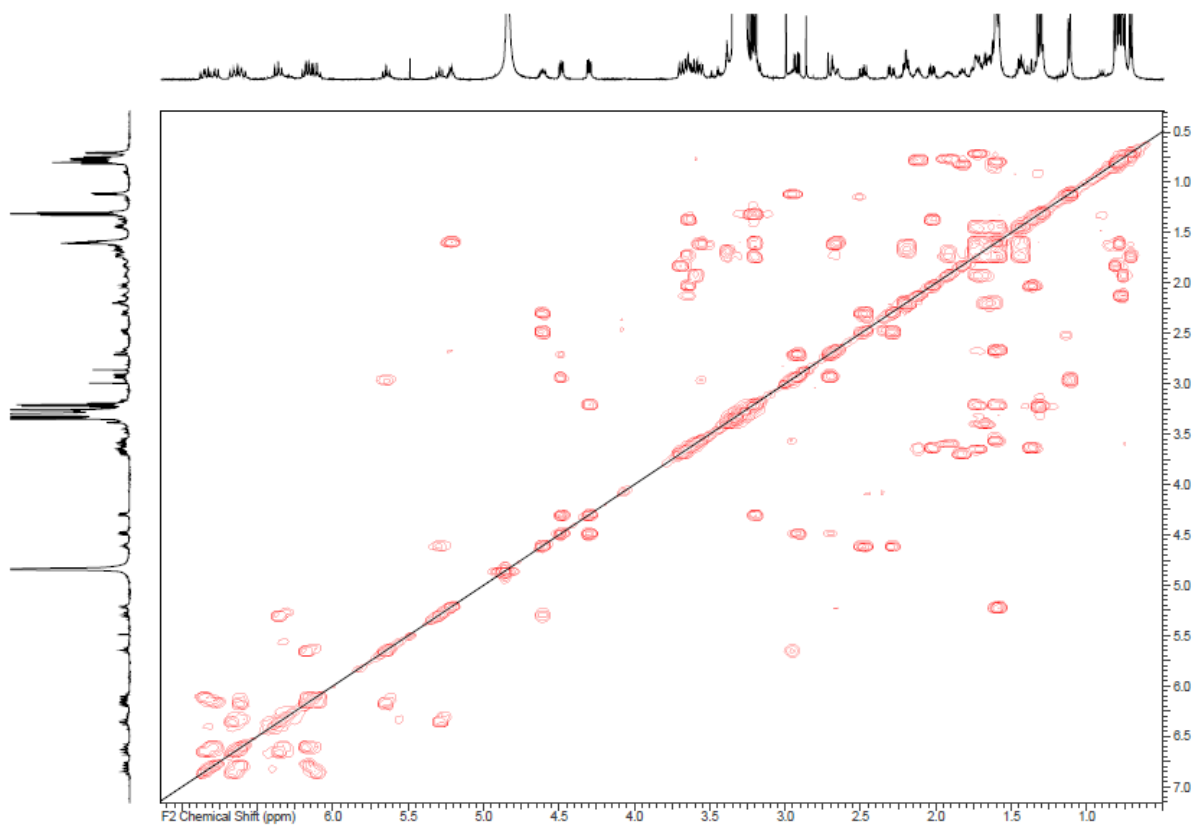


$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-HECADE-NMR-Spektrum Spirangien Q **S13** (^1H : 700 MHz, ^{13}C : 176 MHz).

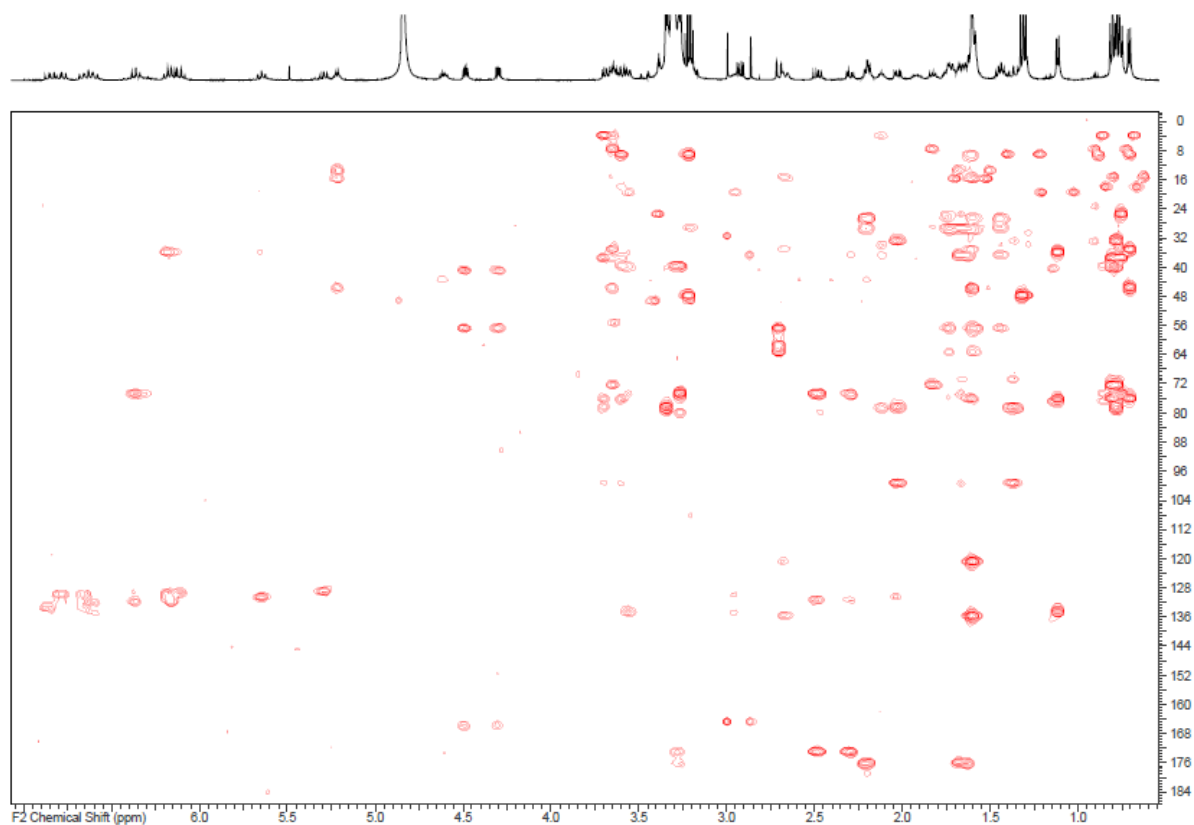




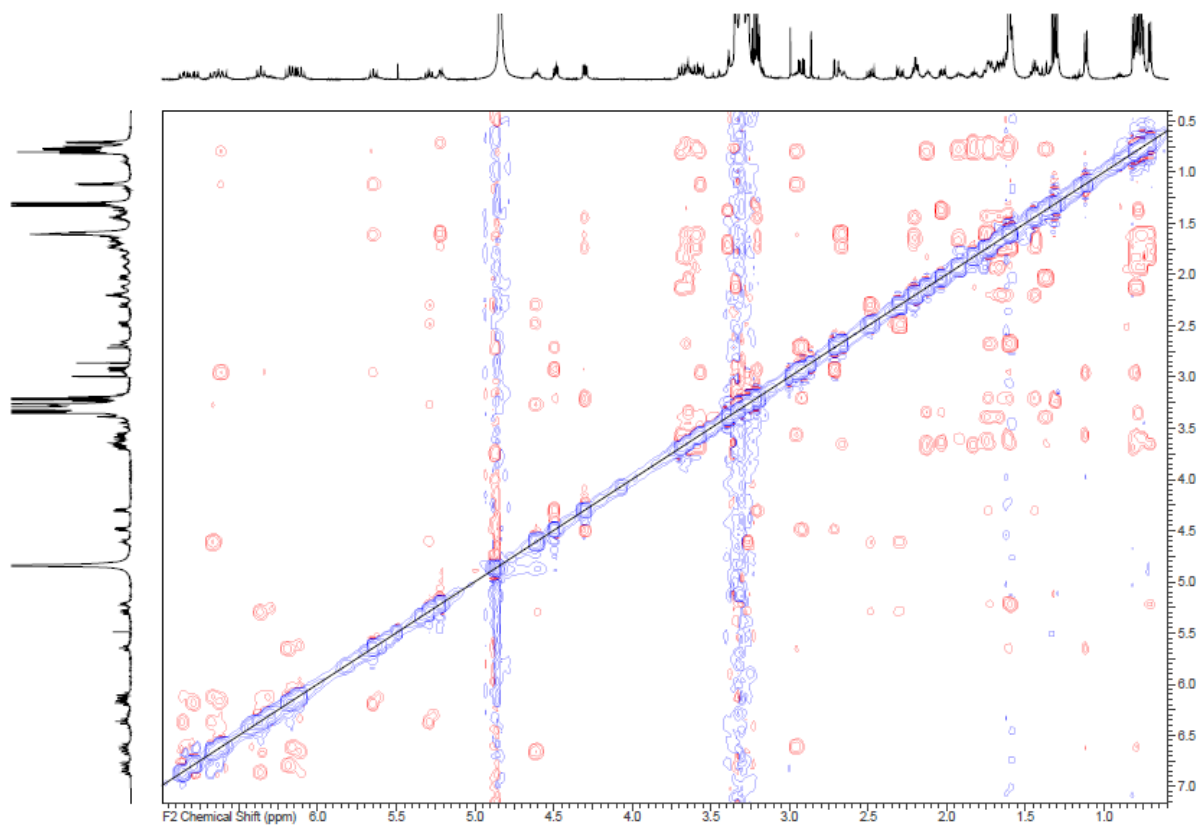
^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum biotinyliertes Spirangien **B-S1** (^1H : 500 MHz).



^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum biotinyliertes Spirangien **B-S1** (^1H : 500 MHz).



^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum biotinyliertes Spirangien **B-S1** (^1H : 500 MHz).



^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum biotinyliertes Spirangien **B-S1** (^1H : 500 MHz).

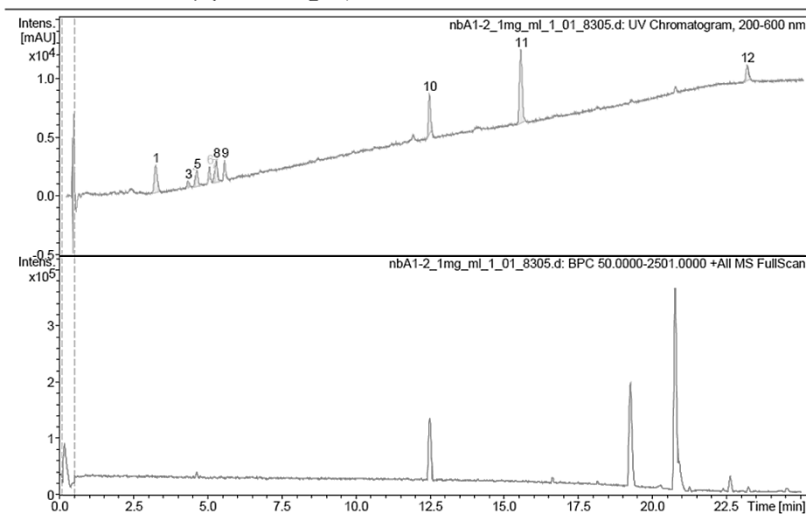
Anhang

Analysis Info

Analysis Name S:\MAXIS-MS\IMCH\2012\12_06\nbA1-2_1mg_ml_1_01_8305.d
 Method pos_screening_ms_100_2500_saeure_onlyms.m
 Sample Name nbA1-2_1mg_ml
 Comment Screening01
 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 1,7um 2.1x50mm

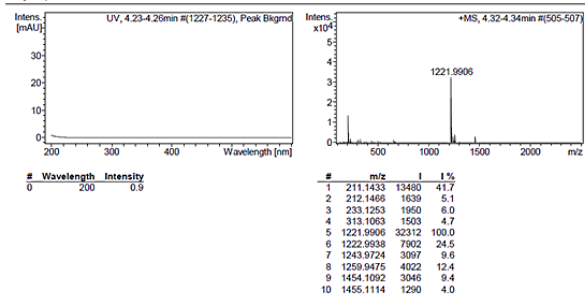
Acquisition Date 01.06.2012 12:53:26

Operator hst
 Instrument maXis

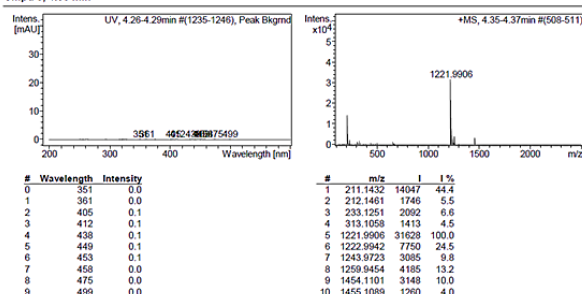


HPLC-MS-Chromatogramm von A1-2.

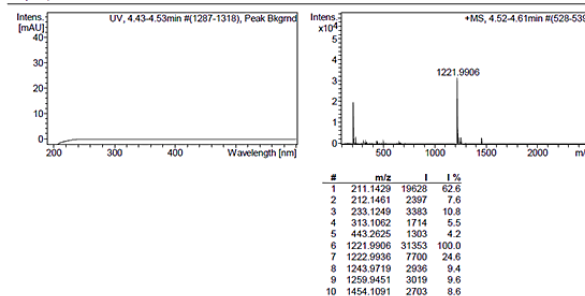
Compd 2, 4.33 min



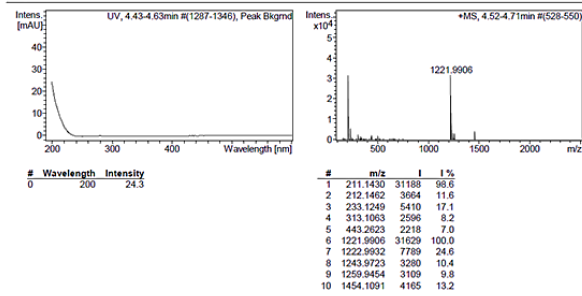
Compd 3, 4.35 min



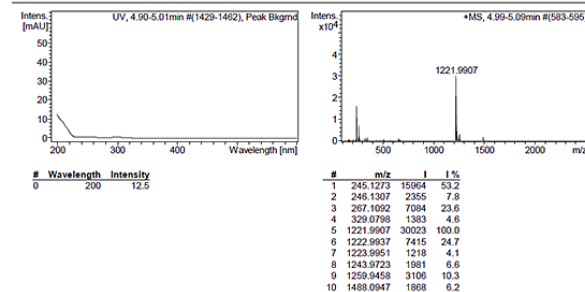
Compd 4, 4.59 min



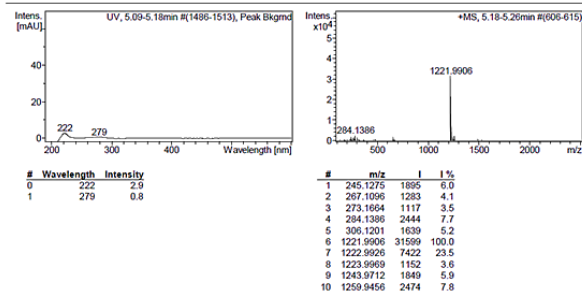
Compd 5, 4.64 min



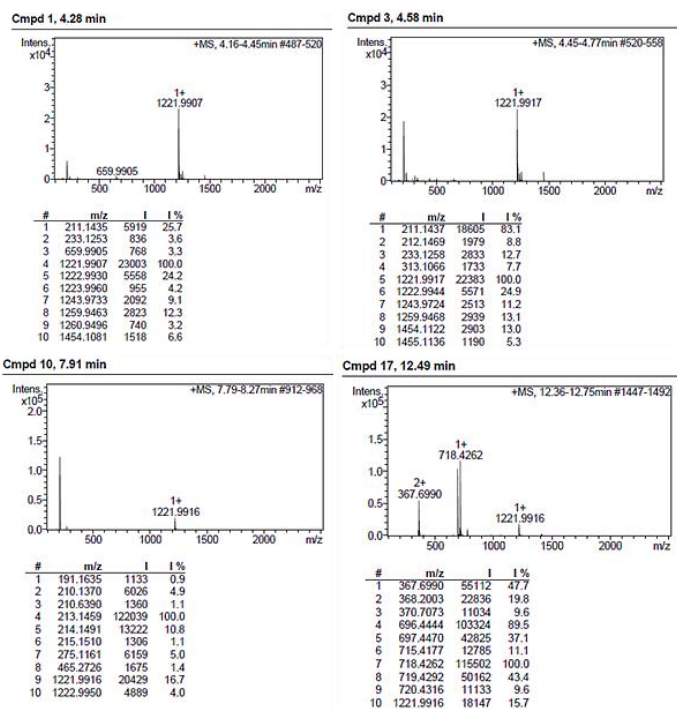
Compd 6, 5.07 min



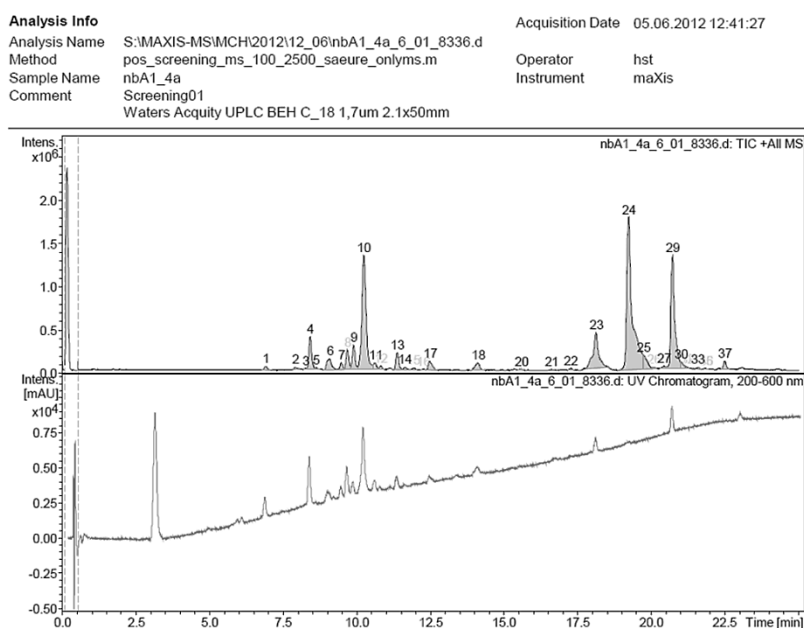
Compd 7, 5.23 min



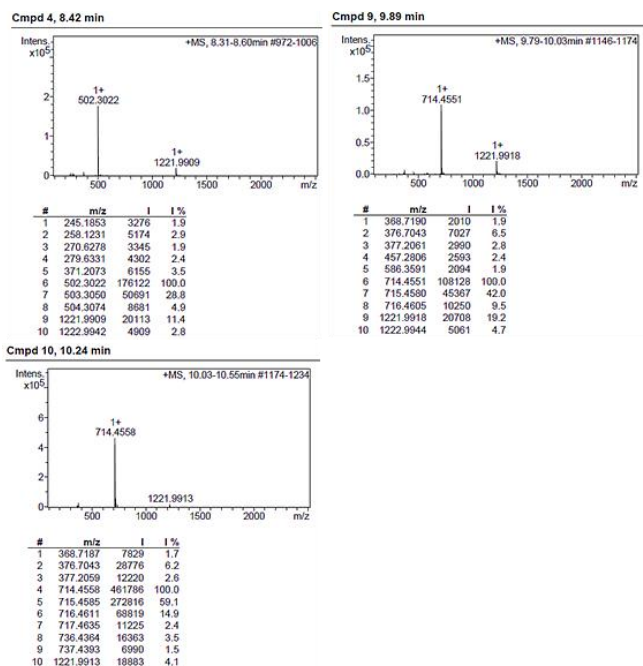
UV- und Massenspektren von A1-2.



Massenspektren von A1-3a.



HPLC-MS-Chromatogramm von A1-4a.



Massenspektren von A1-4a.

Analysis Info

Analysis Name S:\MAXIS-MS\MCH\2012\12_07\A2-1a_NH4Ac_1-B_3_01_8770.d Acquisition Date 24.07.2012 03:04:11

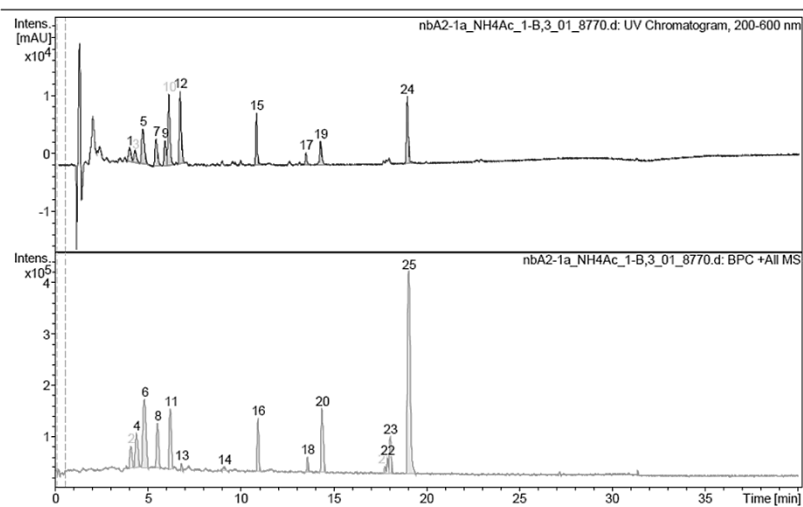
Method pos_screening_ms_100_2500_puffer_only.ms.m Operator ate06

Sample Name nbA2-1a_NH4Ac Instrument maXis

Comment Screening NH4AC

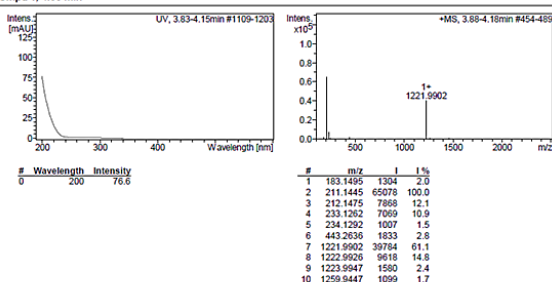
Waters XBridge C18 3.5um 2.1x100mm Column

014030086140 47

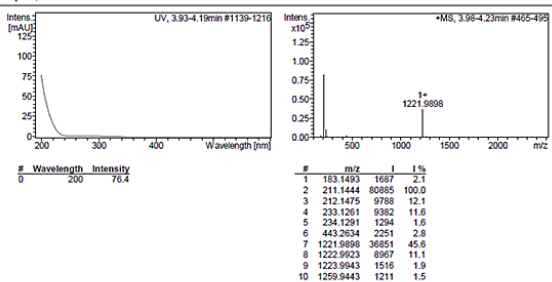


HPLC-MS-Chromatogramm von A2-1a.

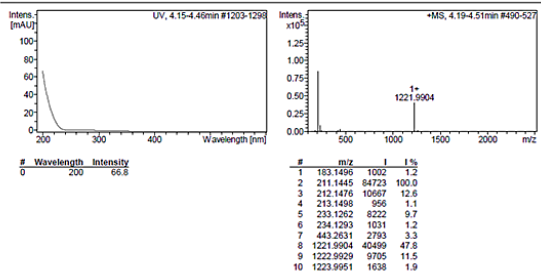
Cmpd 1, 4.00 min



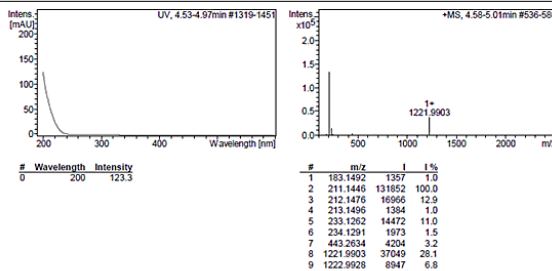
Cmpd 2, 4.08 min



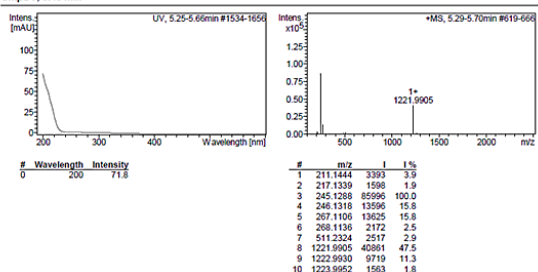
Cmpd 3, 4.30 min



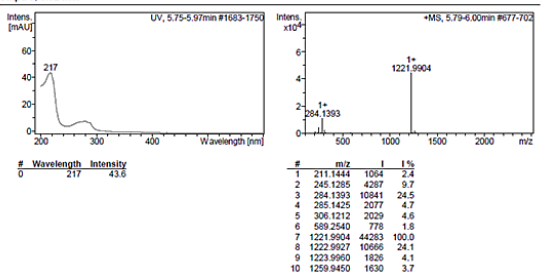
Cmpd 5, 4.72 min



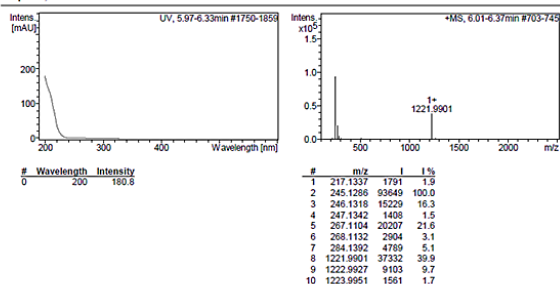
Cmpd 7, 5.43 min



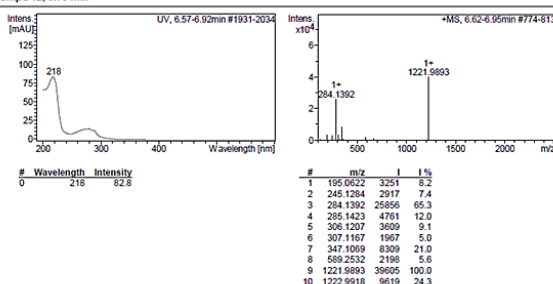
Cmpd 9, 5.92 min



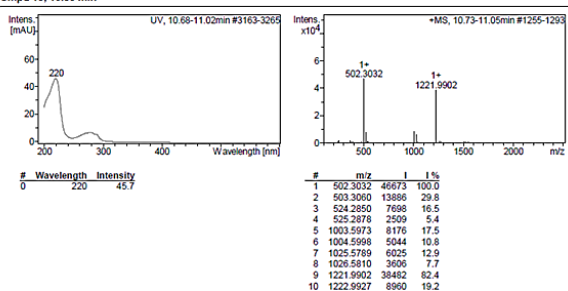
Cmpd 10, 6.12 min



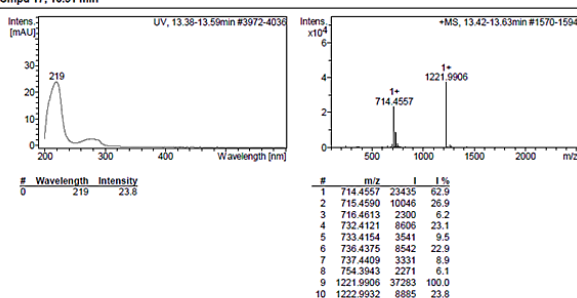
Cmpd 12, 6.73 min



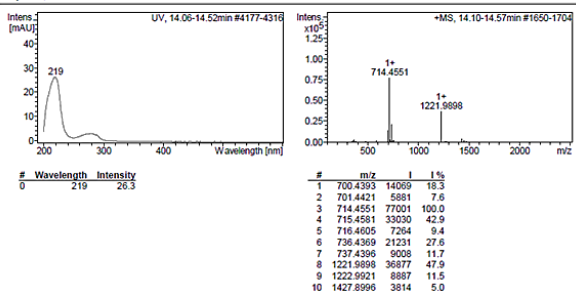
Cmpd 15, 10.85 min



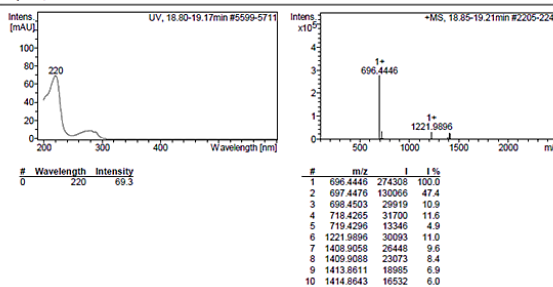
Cmpd 17, 13.51 min



Cmpd 19, 14.29 min



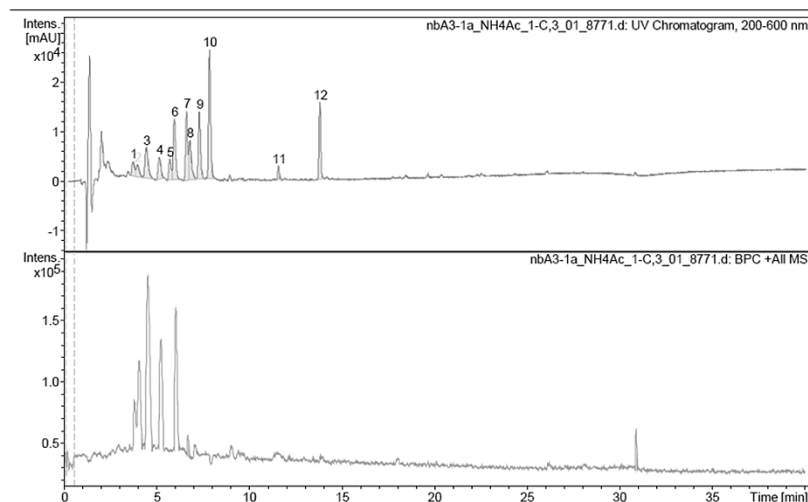
Cmpd 24, 18.97 min



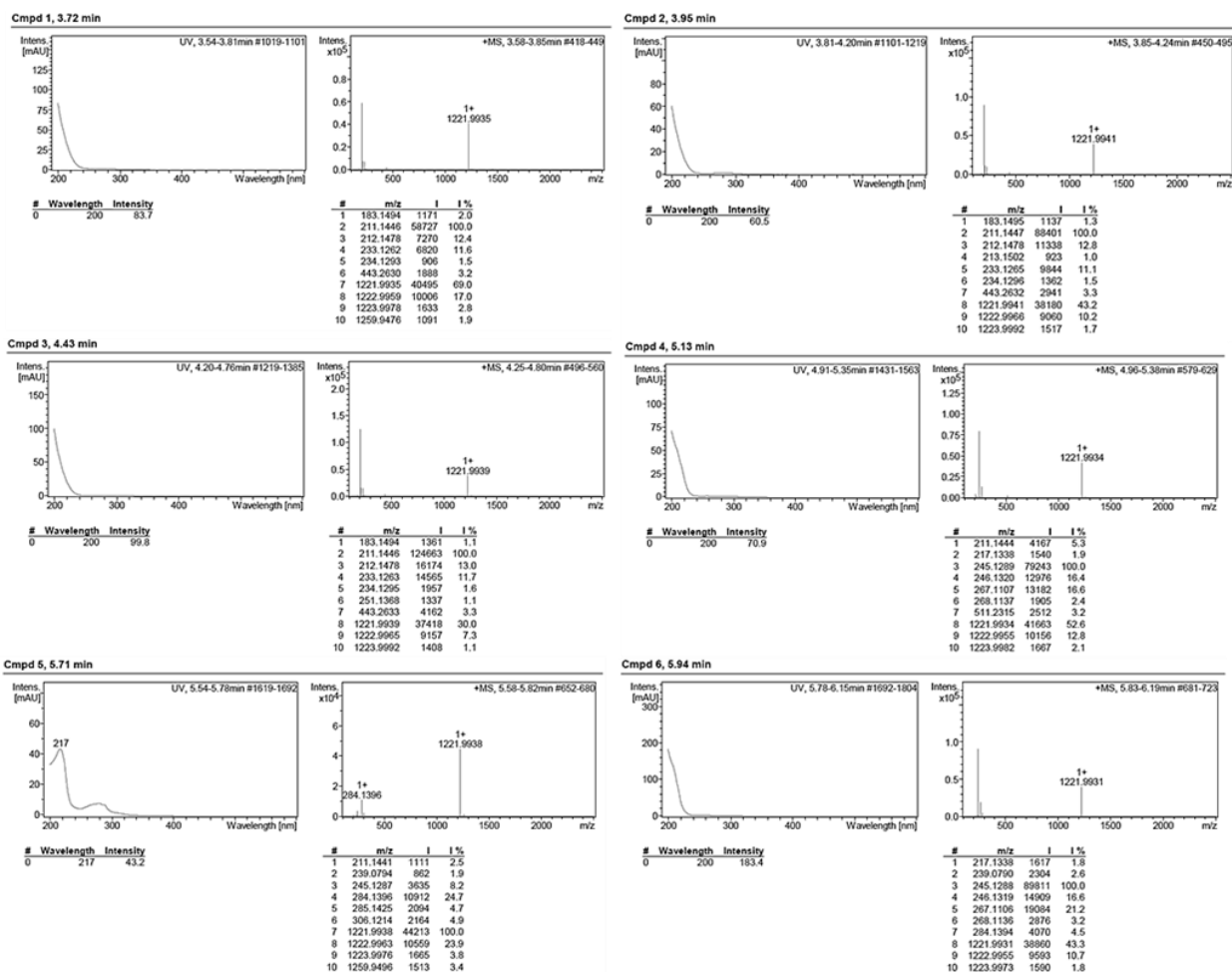
UV- und Massenspektren von A2-1a.

Anhang

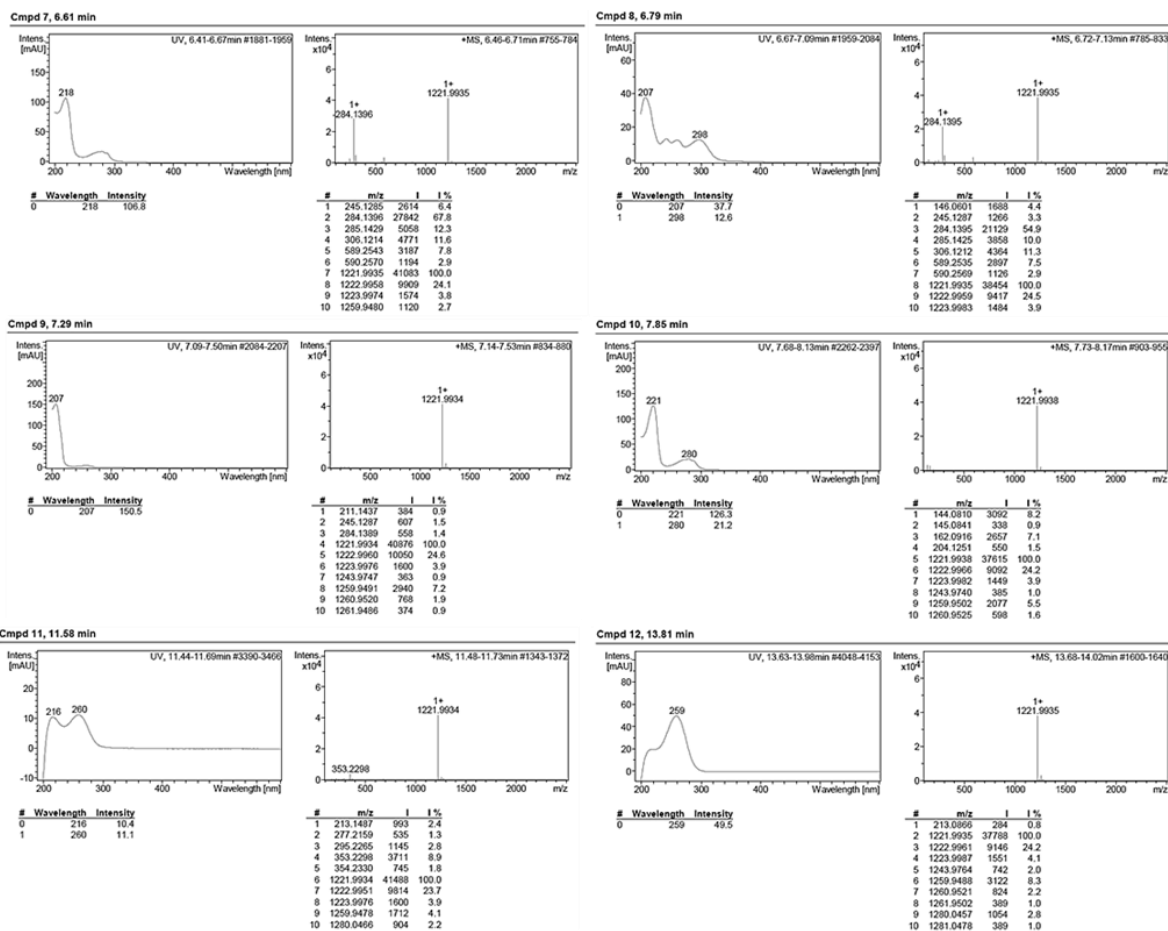
Analysis Info
 Analysis Name S:\MAXIS-MS\MCH\2012\12_07\nbA3-1a_NH4Ac_1-C,3_01_8771.d Acquisition Date 24.07.2012 03:54:56
 Method pos_screening_ms_100_2500_puffer_only.ms.m Operator ate06
 Sample Name nbA3-1a_NH4Ac Instrument maXis
 Comment Screening NH4Ac
 Waters XBridge C18 3.5um 2.1x100mm Column
 014030086140 47



HPLC-MS-Chromatogramm von A3-1a.



UV- und Massenspektren von A3-1a.



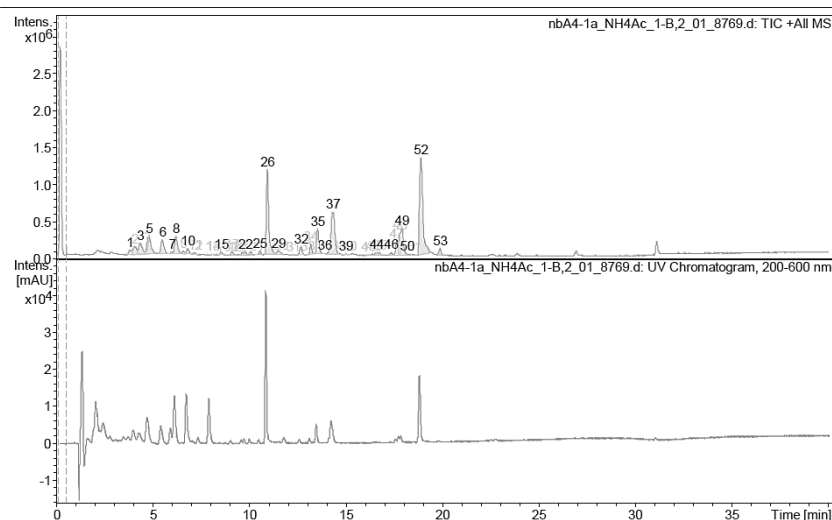
UV- und Massenspektren von A3-1a (Fortsetzung).

Analysis Info

Analysis Name S:\MAXIS-MS\MCH\2012\12_07\nbA4-1a_NH4Ac_1-B_2_01_8769.d
 Method pos_screening_ms_100_2500_puffer_only.ms.m
 Sample Name nbA4-1a_NH4Ac
 Comment Screening NH4Ac
 Waters XBridge C18 3.5um 2.1x100mm Column
 014030086140 47

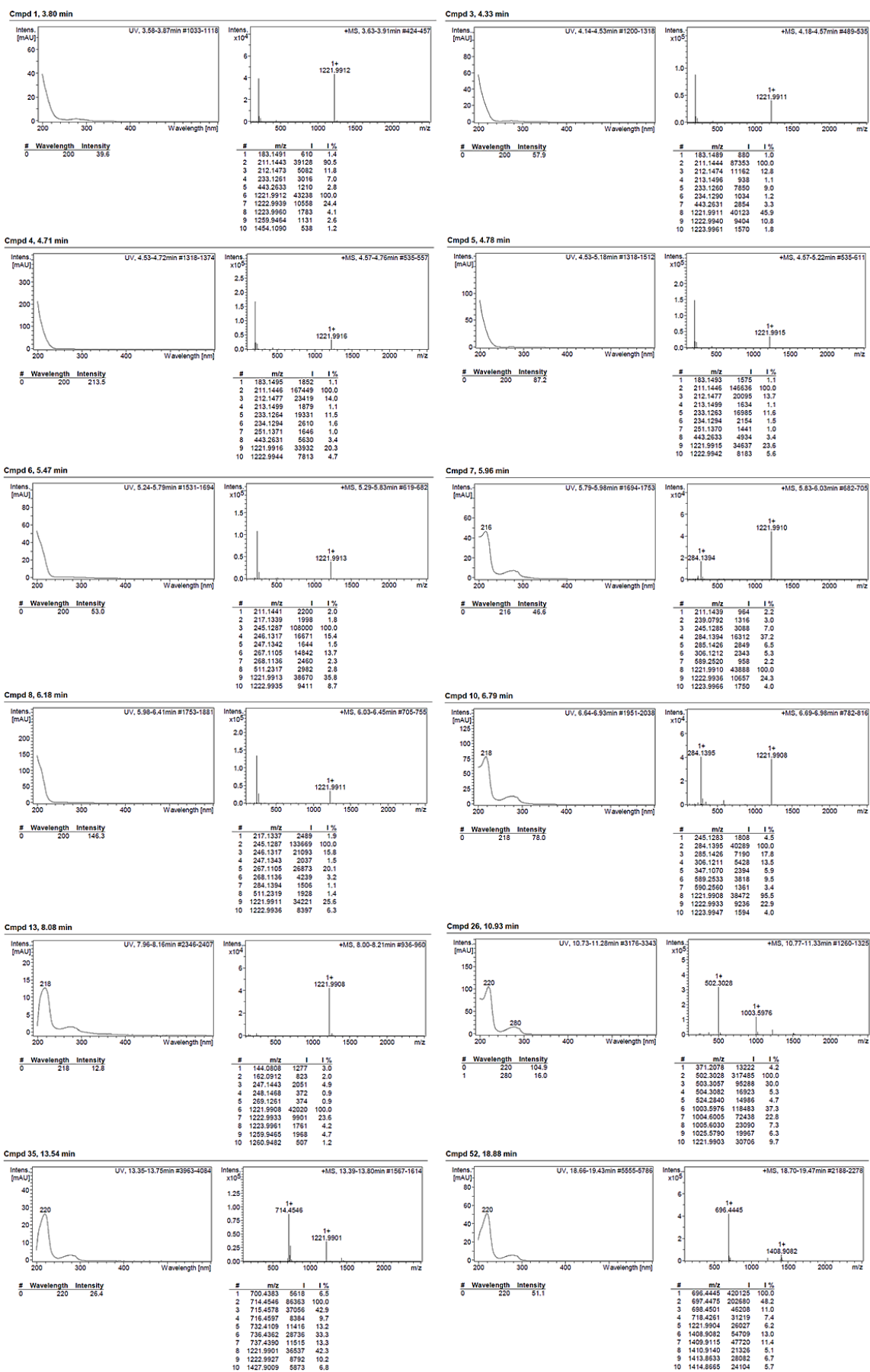
Acquisition Date 24.07.2012 02:13:27

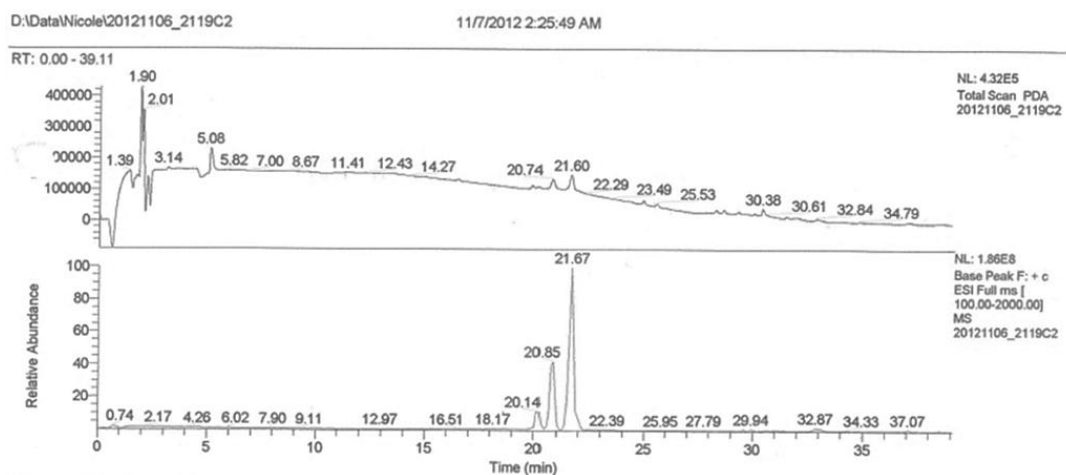
Operator ate06
 Instrument maXis



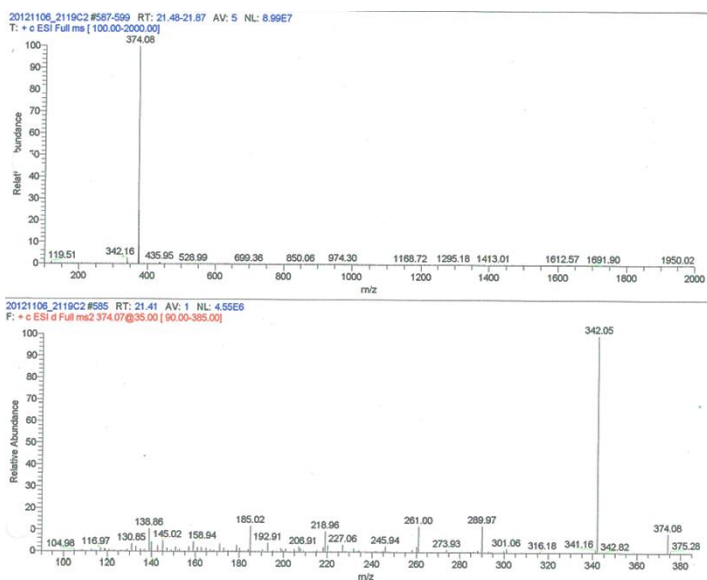
HPLC-MS-Chromatogramm von A4-1a.

Anhang

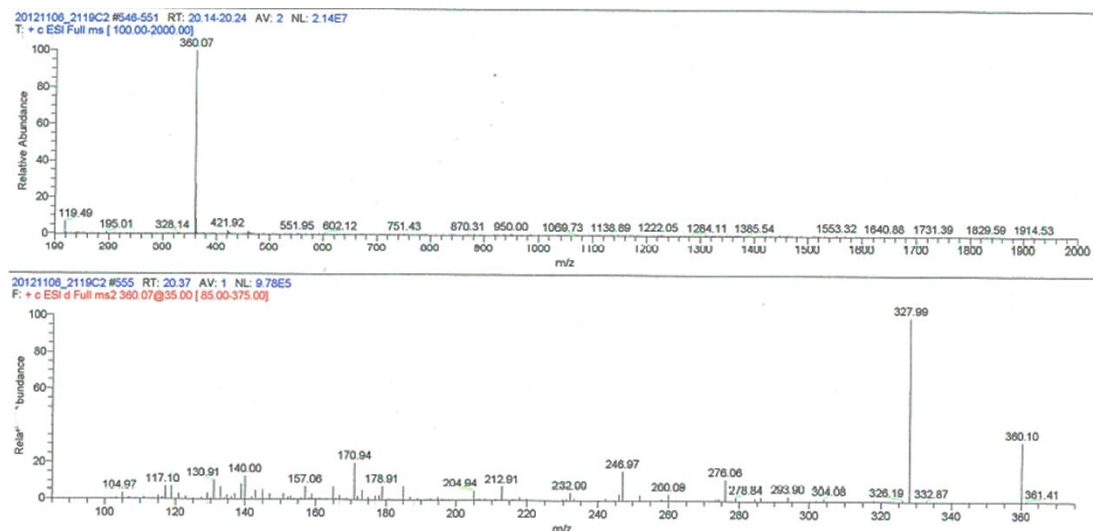




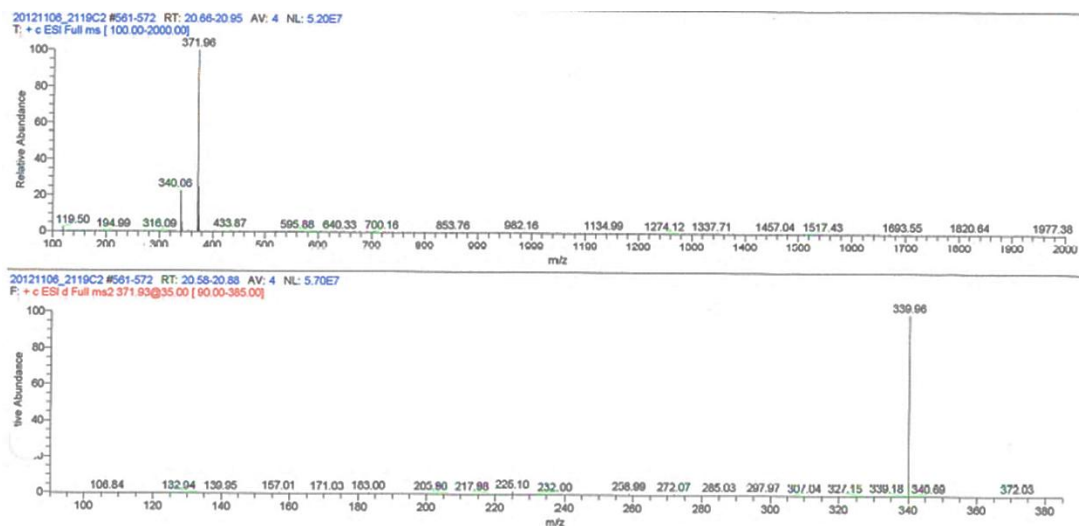
PDA- und +ESI-MS-Chromatogramm der Curacin-enhaltenden Fraktion einer Cyanobakterienmischung.



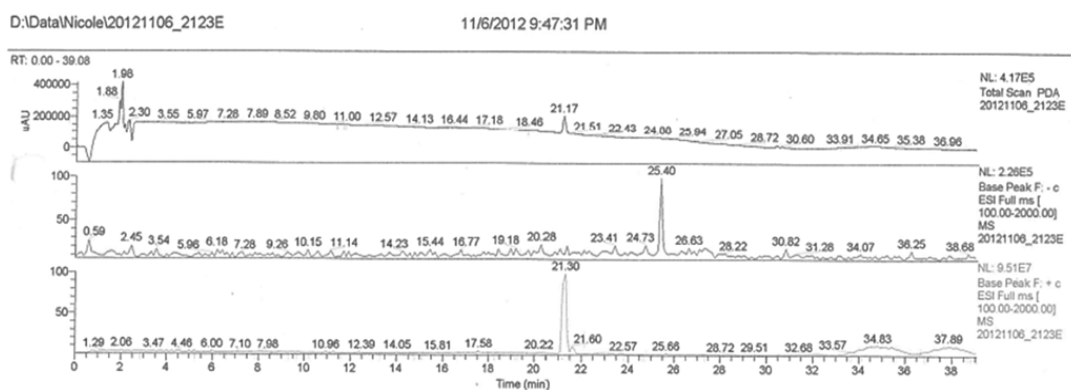
MS- und MS/MS-Spektrum von Curacin A (LC-MS).



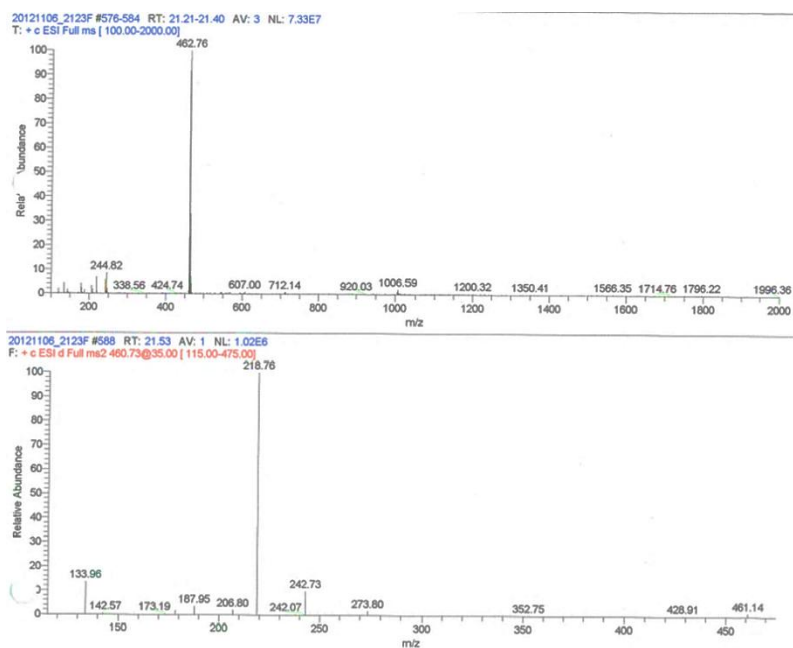
MS- und MS/MS-Spektrum von Curacin D (LC-MS).



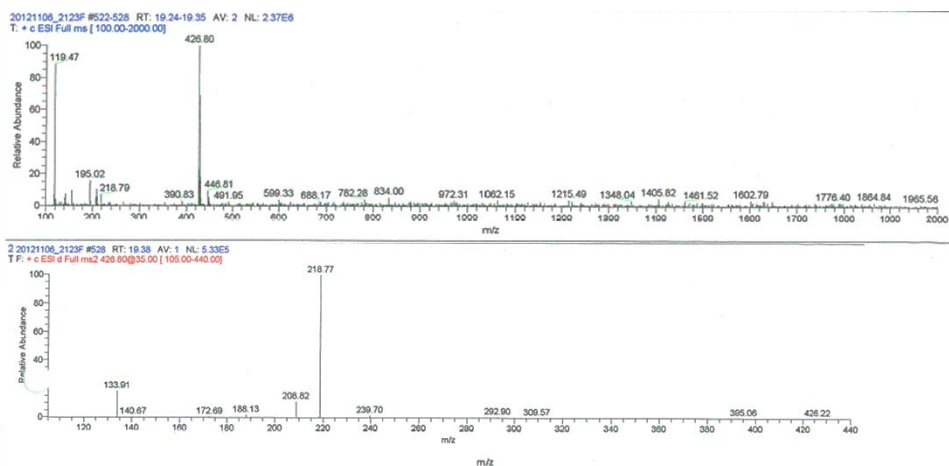
MS- und MS/MS-Spektrum von Curazol (LC-MS).



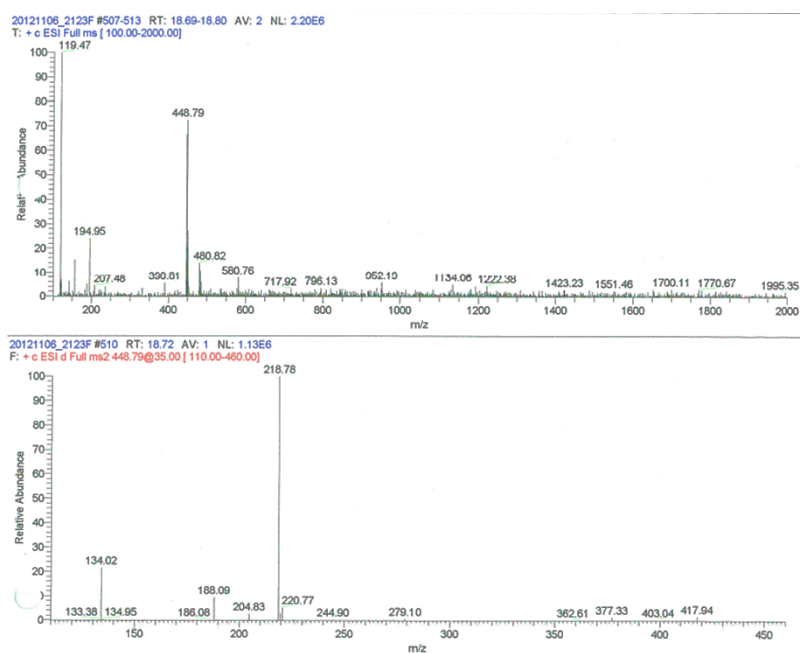
PDA-, -ESI-MS und +ESI-MS-Chromatogramm der Barbamid-enthaltenen Fraktion einer *Moorea* sp.



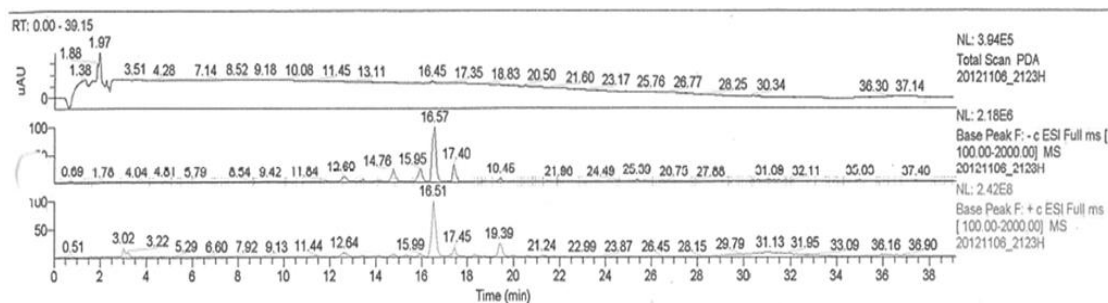
MS- und MS/MS-Spektrum von Barbamid (LC-MS).



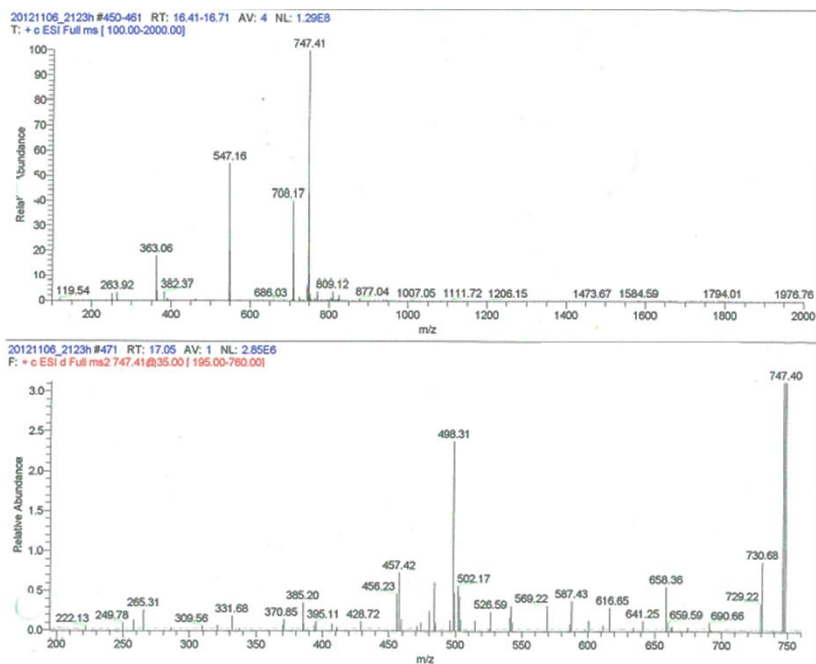
MS- und MS/MS-Spektrum von Dechlorobarbamid (LC-MS).



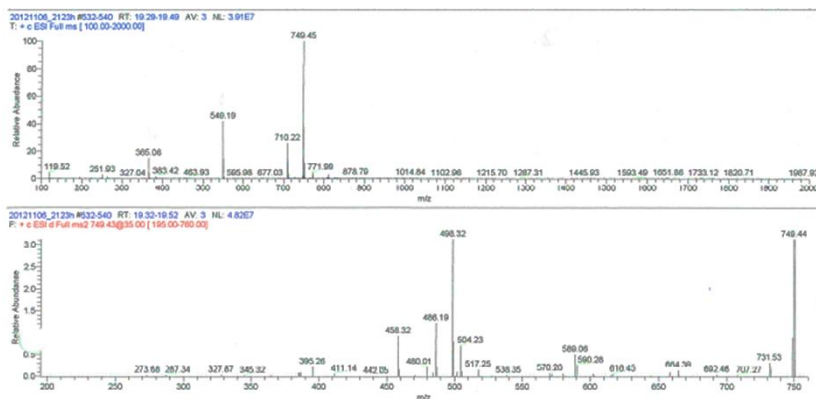
MS- und MS/MS-Spektrum von 4-O-Demethylbarbamid (LC-MS).



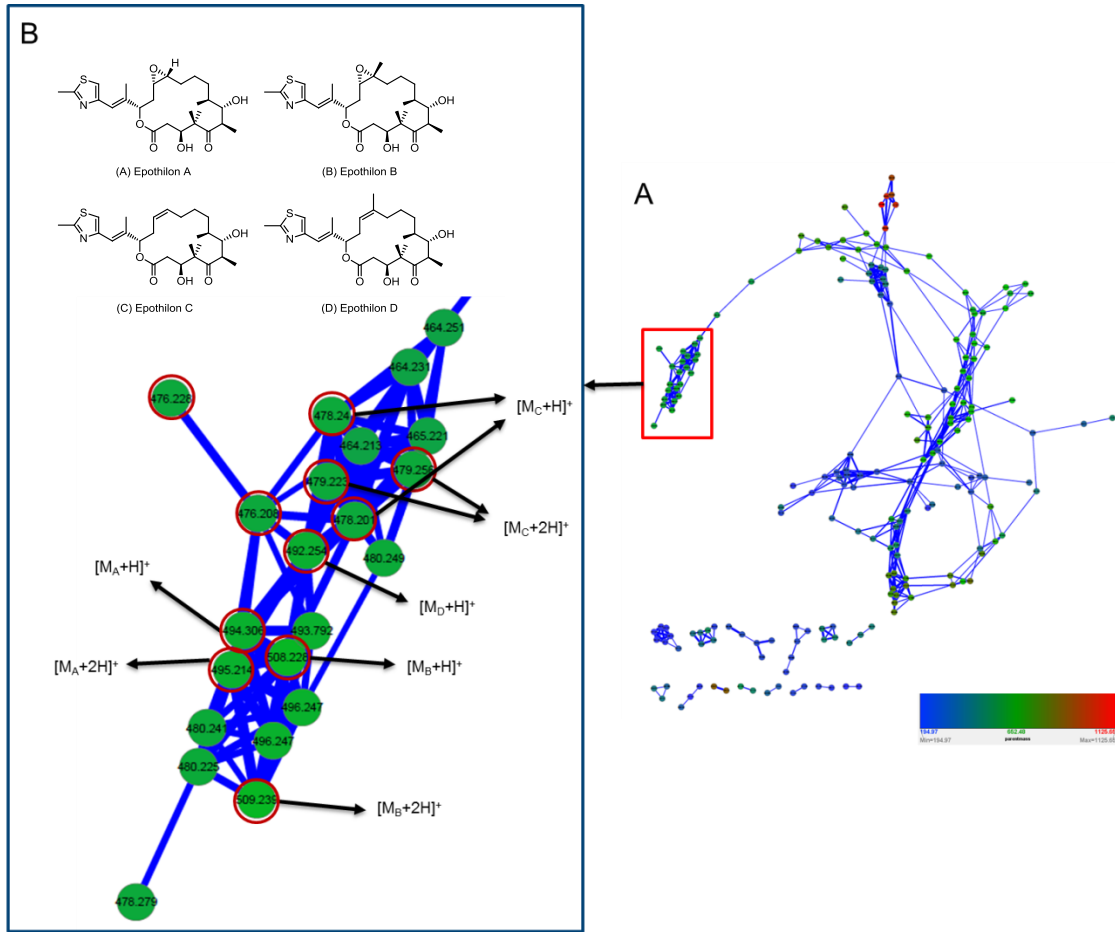
PDA-, -ESI-MS und +ESI-MS-Chromatogramm der Almiramid-enthaltenen Fraktion einer *Moorea* sp.



MS- und MS/MS-Spektrum von Almiramid B (LC-MS).



MS- und MS/MS-Spektrum von Almiramid C (LC-MS).



(A) Gesamtes *Sorangium cellulosum*-Network mit markiertem Cluster, (B) Vergrößertes Epothilon-Cluster.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Kalesse für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung und die Möglichkeit eines Auslandsaufenthalts bedanken. Für die Übernahme des zweiten Gutachtens danke ich Prof. Dr. Marc Stadler.

Außerdem danke ich den ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen der Abteilung Medizinische Chemie für das tolle Arbeitsklima. Bei Christina, Anne, Jan, Johanna und der Abteilung Mikrobielle Wirkstoffe möchte ich mich für die unterhaltsamen Mittagspausen - ob mit oder ohne Kuchen - sowie für die abwechslungsreichen Aktivitäten außerhalb des Labors bedanken. Den Hannoveranern meiner Arbeitsgruppe danke ich für die tollen Arbeitsgruppentreffen.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen Anne, Johanna, Jan und meiner Schwester Nadine bedanken.

Christel Kakoschke danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und Aileen Golasch, Roswitha Reichel und Dr. Gerald Dräger für die Messung der Massenproben. Für die Messung der MALDI-MS-Spektren möchte ich mich bei Anja Meier bedanken. Dr. Christian Richter und Prof. Dr. Harald Schwalbe von der Universität Frankfurt danke ich für die Messung der NMR-Proben am 900 MHz-Gerät.

Für die Unterstützung und die Ratschläge in der Anfangsphase meiner Arbeit danke ich Dr. Jutta Niggemann.

Ich möchte mich bei Aruna Raja, Aman Bhasin und Dr. Marco van Ham für die Hilfestellungen bei den biochemischen Arbeiten und bei Dr. Florenz Sasse und Dr. Lothar Jänsch für die Ratschläge bedanken.

Inge Reupke danke ich für die Anzuchten und die Plattendiffusionstests der epiphytischen Stämme. Ich bedanke mich bei Steffen Bernecker für die Fermentation des *Sorangium cellulosum*-Stammes und bei Wera Collisi und Bettina Hinkelmann für die Zytotoxizitätstests.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. William H. Gerwick vom Scripps Institut für Ozeanographie (SIO, La Jolla) für die herzliche Aufnahme in ihre Gruppe und die tolle Zeit während meines 3-monatigen Auslandsaufenthalts bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während der ganzen Promotion unterstützt haben und immer für mich da waren.

Lebenslauf

geboren am	06. September 1986 (in Minden)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Promotion

seit 12/2011	Leibniz Universität Hannover <ul style="list-style-type: none">- Promotionsstudium am Institut für Organische Chemie in der Gruppe von Prof. Markus Kalesse
09/2012 – 12/2012	Scripps Institut für Ozeanographie (La Jolla) <ul style="list-style-type: none">- Forschungsaufenthalt in der Gruppe von Prof. Dr. W. H. Gerwick

Studium

10/2009 – 10/2011	Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg <ul style="list-style-type: none">- Masterstudium zum M. Sc. Chemie- Gesamtnote: 1,87
10/2006 – 10/2009	<ul style="list-style-type: none">- Bachelorstudium zum B. Sc. Chemie- Gesamtnote: 2,19

Schulische Ausbildung

09/1999 – 07/2006	Gymnasium Stolzenau <ul style="list-style-type: none">- Abitur- Gesamtnote: 2,6
-------------------	---